

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
21 mai 2004 (21.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/041855 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/20

(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; Cabinet Ores, 36, rue
de Saint Petersburg, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/003154

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :

24 octobre 2003 (24.10.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/13585

30 octobre 2002 (30.10.2002)

FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : VIR-
BAC [FR/FR]; 1ère Avenue, 2065m, L.I.D., F-06516 Car-
ros (FR). ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE
NANTES [FR/FR]; Atlanpole La Chantrerie, Route de Ga-
chet, F-44300 Nantes (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : ANDRE
FONTAINE, Geneviève [FR/FR]; 63, boulevard Port Mu-
lon, F-44390 Nort sur Erdre (FR). CHATRENET, Benoît
[FR/FR]; 5 impasse de L'Assomption, F-06100 Nice (FR).
BRANGER, Christine [FR/FR]; La Ville Bachelier,
F-44120 Vertou (FR). AUBERT, André [FR/FR]; Le
Domaine Valmet, 1000 chemin des Rastines, F-06600
Antibes (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çuesEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: PEPTIDES FOR PREVENTING, DIAGNOSING AND TREATING ANIMAL AND/OR HUMAN LEPTOSPIROSIS

(54) Titre : PEPTIDES POUR LA PREVENTION, LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE LA LEPTOSPIROSE ANI-
MALE ET/OU HUMAINE(57) Abstract: The invention concerns peptides capable of inducing protection against leptospires (in particular by vaccination),
immunogenic compositions (diagnostic and/or therapeutic reagents), comprising one or several of said peptides or the antibodies,
nucleic acids or vector derived therefrom. Said peptides are in particular selected among the SEQ ID NO:1 peptide, homologues and
derivatives of said peptide.(57) Abrégé : Peptides susceptibles d'induire une protection contre les leptospires (notamment par voie vaccinale), compositions
immunogènes (réactifs diagnostiques et/ou thérapeutiques), comprenant un ou plusieurs de ces peptides ou les anticorps, acides
nucléaires ou vecteur qui en dérivent. Lesdits peptides sont notamment choisis parmi le peptide de SEQ ID NO:1, les homologues
et les dérivés de ce peptide.

WO 2004/041855 A1

PEPTIDES POUR LA PREVENTION, LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE ET/OU HUMAINE

La présente invention a pour objet des peptides susceptibles d'induire une protection contre les leptospiroses (notamment par voie vaccinale), des compositions immunogènes (réactifs diagnostiques et/ou thérapeutiques), comprenant un ou plusieurs de ces peptides ou les anticorps, acides nucléiques ou vecteur qui en dérivent. Ces compositions sont particulièrement avantageuses puisqu'elles permettent d'induire une réponse ou une protection immune contre différentes souches pathogènes, notamment contre plusieurs sérogroupes pathogènes différents de leptospires et d'assurer un diagnostic commun à tous les cas cliniques quelle que soit l'espèce affectée.

Les leptospires pathogènes sont responsables de maladies infectieuses atteignant l'homme et l'animal. Les leptospiroses font partie des zoonoses surveillées par l'OMS du fait de leur répartition mondiale et de la gravité de la maladie (létale chez 2 à 20 % des malades en fonction de la précocité du diagnostic et du traitement). Chez l'animal, l'impact économique est important, la maladie étant responsable de troubles de la reproduction chez les animaux d'élevage (ruminants ou porc) ou de signes cliniques graves altérant la santé de l'animal de compagnie qu'est le chien, ou celle de l'animal de sport qu'est le cheval.

L'importance des leptospiroses s'illustre notamment par deux aspects : tout d'abord leur impact en santé publique (hospitalisations, incapacités de travail, parfois décès, mise en œuvre de vaccinations dans le cadre de la protection contre les maladies professionnelles dans certains pays dont la France), d'autre part leur impact économique (coût de mise en œuvre des programmes de santé publique, perte de production pour les animaux d'élevage et coût des vaccins employés dans de nombreux pays pour lutter contre cette baisse de production, perte affective de l'animal de compagnie ou/et coût des vaccins disponibles actuellement chez le chien dans la quasi-totalité des pays du monde, et encore perte financière du fait de l'altération des performances sportives du cheval).

La lutte contre ces infections est particulièrement difficile, compte tenu de la complexité bactériologique de ces germes et de la diversité des réservoirs que constituent les animaux de la faune sauvage, porteurs, excréteurs et disséminateurs de ces germes par leurs urines. La complexité bactériologique de ces bactéries est telle qu'actuellement coexistent deux classifications de ces germes : une classification sérologique et une classification génomique.

Selon la classification sérologique, toutes les souches pathogènes ont été classées dans une même espèce pathogène *Leptospira interrogans s.l.* par opposition aux souches saprophytes aquacoles et classées dans *Leptospira biflexa s.l.*

L'espèce *Leptospira interrogans* est divisée en plus de 25 sérogroupes différents, chacun de ces sérogroupes étant lui-même composé de plusieurs sérovars présentant entre eux des communautés antigéniques suffisantes pour leur regroupement. On dénombre ainsi quelque 220 sérovars différents pour l'espèce pathogène. Cette

5 classification est faite sur la base des antigènes inducteurs d'anticorps agglutinants, c'est pourquoi elle est encore la seule employée dans le cadre du diagnostic sérologique de l'infection.

Selon la classification génomique, fondée sur l'étude d'homologies génétiques, l'espèce pathogène *Leptospira interrogans* *sl* a été éclatée en espèces

10 différentes dites genomospecies : *Leptospira interrogans sensu stricto* (*s.s.*), *Leptospira kirshneri*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. fainei*....

L'expression clinique de la leptospirose est très polymorphe en fonction des souches infectantes mais aussi des espèces.

15 Ainsi, l'homme, sensible à la leptospirose, développe généralement des formes aiguës d'évolution rapide, avec atteinte hépatique, rénale ou pulmonaire. La précocité du diagnostic conditionne en général l'efficacité du traitement antibiotique. Le vaccin français dirigé contre *Icterohaemorrhagiae* n'assure une protection que contre ce séro groupe considéré comme le plus pathogène.

20 Chez le chien, espèce animale la plus sensible, une vaccination contre les deux sérogroupes considérés comme dominants dans cette espèce (*Icterohaemorrhagiae* et *Canicola*) a été mise en œuvre. Cependant, le vaccin ne protège que contre ces deux sérogroupes et ne permet pas d'éviter l'infection par une souche sauvage appartenant à un autre séro groupe. Ceci explique le développement de

25 troubles chroniques, encore mal identifiés par les vétérinaires praticiens jugeant qu'un chien vacciné contre "la" leptospirose ne peut développer une forme chronique liée à une infection par une souche sauvage.

Chez le cheval, très exposé du fait de ses conditions d'entretien, de rares formes aiguës mais aussi des formes non caractéristiques telles que des baisses

30 de forme, des contre performances sportives apparaissent. Certains avortements de cette espèce sont également liés à l'infection leptospirosique. Enfin, une affection oculaire récidivante est attribuée aux suites de l'infection par les leptospires. Cette affection compromettant l'avenir de l'animal par la cécité qu'elle peut entraîner est d'ailleurs inscrite en France sur la liste des vices rédhibitoires.

35 Chez les ruminants et le porc, la leptospirose s'exprime essentiellement par des troubles de la reproduction, comprenant soit des avortements, soit de l'infertilité, troubles dont le poids économique peut être estimé suffisamment

important pour que certains pays mettent en place à grande échelle des mesures de vaccination et/ou d'éradication.

Compte tenu de l'importance et de la diversité des formes pathologiques, toute suspicion de leptospirose, qu'il s'agisse d'un cas clinique individuel ou d'un problème d'élevage, fait généralement l'objet de méthodes de confirmation expérimentale. Deux volets du diagnostic (et dépistage) peuvent ainsi être nécessaires, en fonction de la durée d'évolution de la maladie. Dans les cas aigus, la mise en évidence directe du germe est primordiale. Dans les cas chroniques, la mise en évidence de façon indirecte par la réponse sérologique est généralement suffisante en terme de diagnostic, mais, dans un deuxième temps, la reconnaissance des animaux porteurs de germes, et donc excréteurs, nécessite la mise en évidence du germe.

Actuellement, la mise en évidence directe de l'agent pathogène du germe peut être effectuée essentiellement par deux méthodes : l'isolement et la PCR.

L'isolement bactériologique est une méthode très lourde. La fragilité naturelle des leptospires fait que seuls les prélèvements traités dans un délai restreint permettent l'éventuel isolement d'une souche de leptospires. Il faut noter que la probabilité d'isoler un leptospire est en général faible, étant données les exigences de ces germes ; en outre le délai de réponse peut aller jusqu'à plusieurs semaines compte tenu de la lenteur de développement des cultures.

La PCR s'est donc révélée un outil beaucoup plus intéressant en terme de diagnostic. Cependant, cette méthode n'est actuellement développée que chez l'Homme, pour lequel elle est mise en œuvre à partir d'un prélèvement sanguin sur le malade en phase aiguë. La réalisation de la PCR comme méthode de diagnostic sur des tissus comme des produits d'avortement n'est encore qu'au stade de l'expérimentation. Quant au dépistage des animaux excréteurs de leptospires par l'analyse des urines, méthode qui serait utile en élevage, elle n'est pas actuellement opérationnelle.

Le diagnostic sérologique du germe, consistant à mettre en évidence des anticorps témoins d'une infection, est généralement effectué par le test de Microagglutination (MAT) qui est actuellement la méthode de référence. Les inconvénients de cette méthode sont liés à l'hétérogénéité bactériologique des leptospires. La méthode requiert l'utilisation de germes vivants (dont la culture est délicate) et par ailleurs, repose sur la mise en évidence d'anticorps agglutinants induits par les antigènes de surface des leptospires, antigènes qui ont servi à leur classification et donc expriment l'hétérogénéité de ces bactéries. Ceci signifie que la mise en œuvre du diagnostic sérologique nécessite que le sérum du malade soit mis en contact avec une souche vivante représentative de chacun des sérogroupes différents, ce qui oblige à multiplier les manipulations pour un même sérum.

Sur le plan de la protection, il a toujours été considéré dans l'art antérieur que seules les bactéries entières sont susceptibles d'apporter les antigènes protecteurs et par ailleurs qu'il n'existe pas de protection croisée entre des sérogroupes différents. Ce qui signifie qu'actuellement, les vaccins commercialisés sont composés d'une suspension ou plus exactement d'une addition de suspensions de bactéries représentatives de chacun des sérogroupes nécessaires à la protection de l'espèce de destination du vaccin. Compte tenu de la grande diversité des sérogroupes, un choix s'impose en fonction de l'espèce et des conditions épidémiologiques. Ainsi, les vaccins usuels utilisés chez le chien associent une suspension de bactéries inactivées du séro groupe Icterohaemorrhagiae et une du séro groupe Canicola. Des vaccins utilisés chez le porc et les ruminants aux USA associent des suspensions de sérovars appartenant aux sérogroupes : Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa, Canicola et Sejroë (séovar hardjo) par exemple. Le vaccin à usage humain commercialisé en France à l'heure actuelle comporte le séro groupe Icterohaemorrhagiae etc...

Le problème de ces préparations vaccinales est leur défaillance en termes de protection totale contre la leptospirose. Un individu vacciné dont la vaccination est entretenue selon les modalités prescrites par les producteurs de vaccin est protégé contre l'infection et/ou la maladie induite par une souche sauvage appartenant aux seuls sérogroupes présents dans le vaccin. On ne protège donc (et encore cette protection peut-elle être imparfaite) que contre l'infection par un ou plusieurs sérogroupes donnés, représentés dans la préparation vaccinale.

Cependant dans des travaux précédents (Gitton X, André-Fontaine G, André F, Ganière J-P. « Immunoblotting study of the antigenic relationships among eight serogroups of *Leptospira*." *Vet Microbiol* 1992 ; 32:293-303.), nous avons déterminé des antigènes communs à tous les leptospires pathogènes capable d'induire une protection croisée entre plusieurs sérogroupes selon la démarche suivante.

Ainsi, dans une première étape, il a été démontré que la présence de corps bactériens entiers n'était pas indispensable à l'induction d'une protection homologue. On entend par réponse ou protection homologue, la protection induite par une préparation composée par les leptospires appartenant au même séro groupe que les leptospires employés dans l'épreuve virulente réalisée sur animal de laboratoire sensible et permettant d'apprécier l'efficacité et l'authenticité de la protection conférée. Ceci a été démontré par immunisation d'animaux avec un extrait total de leptospires obtenu par éclatement des bactéries. Dans une seconde étape, il a été démontré que des extraits totaux de différents sérogroupes permettaient d'induire une protection hétérologue à l'intérieur de l'espèce *L. interrogans* *sl*. On parle de protection hétérologue lorsque l'épreuve virulente ("challenge") est réalisée avec une souche n'appartenant pas au séro groupe utilisé pour l'immunisation. Ceci a été démontré par

des immunisations réalisées avec des extraits totaux de cultures des sérogroupes Autumnalis, Canicola ou Icterohaemorrhagiae suivies d'épreuves virulentes utilisant des souches Icterohaemorrhagiae ou Canicola dont la virulence est entretenue au laboratoire. La troisième étape a consisté à démontrer que l'antigène ou les antigènes responsables de cette protection croisée étaient absents de, ou très peu exprimés par, l'espèce saprophyte: un extrait total de *L. biflexa* n'a pas permis de protéger des animaux contre une épreuve virulente. La quatrième étape a consisté à identifier les antigènes différenciant l'espèce pathogène de l'espèce saprophyte : Pour cela, des comparaisons de profils électrophorétiques ou d'immunotransferts d'extraits totaux de leptospires de différents sérogroupes pathogènes ou non ont été réalisées et montrent des bandes antigéniques s'échelonnant de 14 à 200 kD dont 24 sont communes à l'espèce pathogène et en particulier la zone 21-26 kD qui est séro groupe-spécifique (Gitton X, André-Fontaine G, André F, Ganière J-P. « Immunoblotting study of the antigenic relationships among eight serogroups of *Leptospira*." *Vet Microbiol* 1992 ; 32:293-303.). Des immunotransferts d'extraits totaux reconnus par des sérums de chiens infectés ont été réalisés ; ceci a permis de montrer que la zone 21-31 kD et plus particulièrement 25-31, 32-34 et 45 kD seraient associés à l'appartenance à l'espèce pathogène, la zone antigénique différenciant l'espèce pathogène de l'espèce saprophyte se situait donc entre 21 et 45 kD. (Gitton X, Buggin-Daubié M, André F, Ganière J-P, André-Fontaine G. « Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs ». *Vet Microbiol* 1994 ; 4:87-97.). Cependant l'utilisation d'un extrait total permettait la migration des antigènes protéiques mais également des antigènes lipopolyosidiques. Or l'art antérieur définit ces derniers comme responsables de la protection contre la leptospirose. La cinquième étape devait donc apprécier le rôle respectif éventuel dans la protection croisée des antigènes lipopolyosidiques et des antigènes protéiques préparés séparément. Cette cinquième étape a défini la nature de l'antigène ou des antigènes responsables de cette protection croisée. Des extraits purifiés de lipopolysaccharides (LPS) ont été préparés par la méthode d'extraction à chaud phénol-eau de Westphall. Ce mode de préparation permet d'obtenir la fraction lipopolyosidique (LPS) pure. L'extrait résiduel contient les protéines (simples ou complexes), mais aussi du LPS résiduel. Nous avons démontré que l'extrait pur LPS est responsable d'un puissant effet protecteur, mais exclusivement homologue. Ceci confirme bien les données antérieures concernant l'absence de protection croisée entre sérogroupes. En effet, le LPS correspond aux structures antigéniques externes responsables de la production d'anticorps agglutinants utilisés comme base de la classification sérologique, mais aussi responsables de l'effet protecteur des préparations vaccinales. Selon l'art antérieur, il était donc nécessaire qu'un vaccin soit capable d'induire la production d'anticorps agglutinants à des taux significatifs pour

protéger un animal contre une infection par un leptospire homologue. La sixième étape a consisté à contrôler la capacité d'un extrait protéique d'une souche Autumnalis ou Canicola purifié de toute trace de LPS d'induire une protection homologue au même titre que le LPS purifié mais aussi d'induire une protection contre une épreuve virulente hétérologue observée lors des essais précédents avec des extraits totaux. Ceci a été réalisé par une immunisation avec un extrait protéique obtenu par une extraction chloroforme méthanol effectuée sur l'interface d'une extraction phénol eau ayant permis la purification préalable du LPS et suivie d'une épreuve virulente homologue ou hétérologue suivant le cas (Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, Andre-Fontaine G. « Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine ». 2000 Aug 15 ; 19(1):86-94.). Lors de la septième étape, il a été possible par l'utilisation du Prep-cell de Biorad de séparer différentes protéines ségrégeant dans cette zone afin de réaliser leur séquençage. Trois bandes ont fait l'objet de l'étude en séquençage, une protéine de 32 kD et deux protéines de 34 kD. Les séquences NH₂ terminales ont été définies ainsi qu'une séquence interne d'une douzaine d'acides aminés correspondant au pic majeur (pic 14) obtenu en HPLC. La protéine de 32 kD a été désignée PPL. Dans une huitième étape, des sondes nucléotidiques dégénérées ont été construites, le gène de PPL a été cloné, et la production de protéine PPL recombinante a été effectuée et a permis la production d'anticorps monoclonaux. Le gène PPL a été inséré dans un adénovirus humain non répliquatif et une protection efficace contre des épreuves virulentes effectuées sur la gerbille, a été observée après administration de ces virus recombinants en particulier comme vaccins (Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre-Fontaine G, Eloit M. « Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. » *Infect Immun.* 2001 Nov ; 69(11) : 6831-8.).

Toutefois, la protéine recombinante produite par un système procaryote ne permet pas d'apporter de protection significative contre les différentes souches de leptospires pathogènes.

Par ailleurs, le diagnostic sérologique des leptospiroses par le test de microagglutination est tardif et ne permet pas une détection précoce de la maladie. Il n'est pas rare qu'un animal meure de leptospirose avant que celle-ci soit diagnostiquée.

Le document WO 01/59123 décrit l'identification d'une protéine désignée PPL de 32 kD, comportant une séquence SEQ ID NO:1 = TFLPYGGSVINYYGYVK, cette protéine étant commune à certaines souches pathogènes de leptospirose. La séquence de PPL comprend 272 acides aminés. Ce document indique

avoir pour objet des fragments de PPL mais n'en décrit aucun en particulier. La séquence de cette protéine PPL intégrée dans un vecteur adéno-virus a montré un effet de protection hétérologue.

Le document WO 99/42478 décrit une protéine membranaire LipL32 qui est présente chez certaines souches pathogènes de leptospire. Cette protéine comporte 272 acides aminés. Elle peut être utilisée pour induire une réponse immunitaire dirigée contre certaines souches de leptospires.

Toutefois, il n'est nullement envisagé dans ce document que cette protéine permette d'induire une protection hétérologue contre différentes souches de leptospires.

Le document WO 96/36355 décrit deux protéines membranaires de souches pathogènes de leptospire, LipL1 et LipL2, d'un poids respectif de 35 kDa et 41 kDa. Ces protéines sont utilisées pour produire une réponse immunitaire contre certaines souches de leptospires.

Toutefois, il n'est nullement envisagé dans ce document que cette protéine permette d'induire une protection hétérologue contre différentes souches de leptospires.

Les inventeurs se sont donc fixé pour objectifs l'identification de peptides susceptibles d'induire une protection efficace contre les différentes souches de leptospires pathogènes, cette protection pouvant être induite de façon directe, sans passer par l'expression de ces peptides dans un adénovirus.

Les inventeurs se sont également fixé pour objectifs la mise au point d'une méthode de détection précoce de l'infection par les différentes souches de leptospires pathogènes afin de permettre un diagnostic de leptospirose à un stade de l'infection où il est efficace d'administrer un traitement à l'individu.

La présente invention permet à présent de résoudre les inconvénients des différentes méthodes de vaccination, de dépistage, de diagnostic et de traitement, décrites dans l'art antérieur. La présente invention décrit en effet l'identification d'un motif antigénique de leptospire : le peptide PP, commun à de multiples sérogroupes de leptospires, notamment de leptospires pathogènes. La présente invention permet également la production de polypeptides, peptides et anticorps, utilisables soit dans des approches vaccinales soit dans des approches thérapeutiques efficaces et susceptibles d'induire une protection contre de multiples sérovars de leptospires pathogènes. La présente invention permet ainsi la réalisation de tests de détection ou de dépistage des leptospires pathogènes eux-mêmes ou de l'infection qu'ils provoquent, non restreints à des sérovars particuliers. La présente invention permet en outre la réalisation de tests de détection plus simples que les méthodes MAT décrites dans l'art antérieur, puisqu'elles ne nécessitent pas la culture de germes. La présente

invention décrit en outre des acides nucléiques, vecteurs, sondes, amorces ainsi que des cellules recombinantes utilisables pour la production des polypeptides, peptides ou protéines ou pour la détection de leptospires ou de leurs produits dans tout échantillon test, biologique (par exemple fluides biologiques tels que sang, plasma, urine, lait, liquide céphalorachidien; tissu, organe, culture cellulaire, etc.) ou d'autre origine (comme par exemple un échantillon souillé par des matières biologiques, telles qu'une eau de rivière, une eau stagnante, une eau de boisson, une eau stockée utilisées par des entreprises telles que des ardoisières, des maraîchers, etc).

Le premier objet de l'invention est un peptide dénommé PP, fragment d'une protéine PPL de 32 kDa décrite dans la Demande Internationale WO01/59123. Ce peptide PP est constitué de 25 acides aminés et est représenté par la séquence SEQ ID N°: 1 représentée ci-dessous :

SEQ ID NO : 1 Lys-Ala-Lys-Pro-Val-Gln-Lys-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Gly-Asp-Asp-Thr-Tyr-Lys-Glu-Glu-Arg-His-Asn-Lys

La séquence SEQ ID NO:1 et, de façon plus générale, les composés de la présente invention sont dotés d'avantages imprévisibles par rapport aux protéines de l'art antérieur :

- obtention d'une protection contre les différentes souches de leptospires pathogènes à partir d'un seul composé,
- obtention d'un diagnostic précoce de leptospirose,
- obtention d'un diagnostic discriminant (infection/vaccin) de leptospirose.

L'invention a également pour objet des homologues du peptide PP, ses sels pharmaceutiquement acceptables, ses fragments fonctionnels, ses analogues chimiques et certains dérivés chimiques de ce peptide.

Par homologues, on entend au sens de la présente invention des peptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins 60% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1, encore plus préférentiellement 70%, encore plus préférentiellement encore 80%, de manière préférée au moins 90%, et encore plus favorablement au moins 95%, ou mieux, 98% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1.

Par similarité de X% entre un peptide P et la séquence SEQ ID NO : 1, on entend que : lorsque la séquence de P est alignée face à SEQ ID NO : 1, dans le même sens, X% des acides aminés de P sont identiques à l'acide aminé correspondant de SEQ ID NO : 1 ou sont remplacés par un acide aminé

de même classe, étant entendu que si les séquences ne sont pas de même longueur, on placera éventuellement un espace entre les acides aminés de la séquence concernée. Le degré d'homologie peut être évalué par des méthodes bien connues de l'homme du métier (par exemple, WILBUR W.J. et al Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80, 726-730 (1983) ; MYERS et al, *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11-17 (1988)).

Au sens de la présente invention l'homologie avec la SEQ ID NO : 1 s'étend aux peptides comportant de 15 à 40 acides aminés et dont la séquence, une fois alignée avec SEQ ID NO : 1, avec les espaces placés entre les acides aminés appropriés, possède une similarité comprise dans les valeurs indiquées ci-dessus. Préférentiellement, l'homologie s'étend aux peptides comportant de 20 à 30 acides aminés, encore plus préférentiellement de 22 à 28 acides aminés.

Par acides aminés de même classe, on entend un acide aminé possédant des propriétés chimiques sensiblement identiques.

En particulier, on entend par ce terme des acides aminés ayant sensiblement la même charge, et/ou la même hydrophilie ou hydrophobie, et/ou la même aromaticité.

De tels regroupements d'acides aminés incluent généralement :

- (i) glycine, alanine, valine,
- (ii) isoleucine, leucine,
- (iii) tryptophane, tyrosine, phénylalanine,
- (iv) acide aspartique, acide glutamique,
- (v) arginine, lysine, histidine,
- (vi) asparagine, glutamine,
- (vii) sérine, thréonine.

D'autres substitutions d'acides aminés peuvent être envisagées au sens de la présente invention dans lesquelles on remplace un acide aminé par un autre acide aminé de même classe, c'est-à-dire possédant des propriétés comparables, l'acide aminé de substitution étant un acide aminé non naturel.

C'est le cas, par exemple, des énantiomères et des diastéréoisomères des acides aminés naturels, de l'hydroxyproline, de la norleucine, de l'ornithine, de la citruline, de la cyclohexylalanine, des acides β -aminés tels que l'acide 3-amino-propionique, des acides Ω -aminés tels que l'acide 4-amino-butyrique. De tels acides aminés sont bien connus de l'homme du métier et peuvent être préparés par des méthodes connues. Sont également incluses dans la présente invention les substitution d'un ou plusieurs acides aminés par un acide aminé non naturel porteur d'un

groupement permettant la détection du peptide, tels qu'un acide aminé porteur d'un groupement fluorescent, photoactivable ou un acide aminé radiomarqué.

Un exemple particulier d'homologue est constitué par les fragments fonctionnels des peptides selon l'invention : ce sont des peptides répondant à l'une des séquences selon l'invention dans lesquelles un ou plusieurs acides aminés sont ôtés de la séquence mais qui conservent une activité immunogéniques comparable à celle décrite pour le peptide PP, en particulier un titre en anticorps comparable. Les fragments fonctionnels préférés des peptides selon l'invention sont ceux pour lesquels au plus six acides aminés, plus préférentiellement 4 acides aminés, plus préférentiellement encore 2 acides aminés, sont ôtés. Encore plus préférentiellement, ceux pour lesquels un acide aminé est ôté.

Habituellement, des substitutions d'acides aminés de même classe permettent de conserver au peptide son activité immunogène. Des substitutions appropriées pourront être déterminées en testant les propriétés antimicrobiennes des peptides obtenus en utilisant des tests d'activité tels que ceux décrits ci-après. L'invention concerne plus spécifiquement des molécules induisant un titre en anticorps et/ou conférant une protection comparable à ceux susceptibles d'être obtenus par l'utilisation du peptide PP.

Selon l'invention, le terme sels se rapporte à la fois aux sels d'amine d'une fonction carboxyle de la chaîne peptidique aussi bien qu'aux sels acides d'addition à un groupe amine de cette même chaîne polypeptidique. Les sels d'une fonction carboxyle peuvent être formés avec une base inorganique ou organique. Les sels inorganiques incluent par exemple les sels de métaux alcalins tels que les sels de sodium, de potassium et de lithium ; les sels alcalino-terreux tels que par exemple les sels de calcium, de barium et de magnésium ; les sels d'ammonium, les sels ferreux, ferriques, les sels de zinc, de manganèse, d'aluminium, de magnésium. Les sels avec des amines organiques incluent ceux formés par exemple avec la triméthylamine, la triéthylamine, la tri(n-propyl)amine, la dicyclohexylamine, la triéthanolamine, l'arginine, la lysine, l'histidine, l'éthylènediamine, la glucosamine, la méthylglucamine, les purines, les pipérazines, les pipéridines, la caféine, la procaine.

Les sels d'addition acides incluent, par exemple, les sels avec des acides minéraux tels que par exemple l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide nitrique ; les sels avec des acides organiques tels que par exemple, l'acide acétique, l'acide oxalique, l'acide tartrique, l'acide succinique, l'acide maléique, l'acide fumarique, l'acide gluconique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide ascorbique, l'acide benzoïque.

Des dérivés chimiques des peptides selon l'invention incluent les composés des-alpha amino peptides, les dérivés N-alpha acyl substitués de la forme RCO-, dans laquelle R représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou aralkyle, linéaire, ramifié, ou cyclique comprenant de 1 à 50, préférentiellement de 1 à 8 atomes de carbone. Le groupement N-alpha acyle préféré est le groupement acétyle. De tels substituants amine-terminaux peuvent augmenter l'activité du peptide en ralentissant ou en empêchant la dégradation enzymatique des peptides *in vivo*.

D'autres dérivés chimiques des peptides selon l'invention incluent les dérivés substitués sur la fonction acide C-terminale par un groupement choisi parmi -NH₂, les alkyloxy, alkylthio ou alkylamino de la forme -OR, -SR or -NHR, dans lesquels R peut représenter une chaîne alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou un groupement aralkyle, linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 1 à 50, préférentiellement de 8 à 50 atomes de carbone.

Une autre sorte de dérivé chimique des peptides selon l'invention inclut les dérivés porteurs d'un substituant pharmacophore, tel qu'un groupement fluorescent, un groupement photoactivable, un groupement radiomarké ou tout autre groupement permettant la détection par spectroscopie et l'évaluation quantitative du peptide selon l'invention dans un échantillon biologique sans dégradation de l'échantillon biologique.

Préférentiellement, selon l'invention, les acides aminés dont sont constitués les peptides sont des énantiomères L. Toutefois, un ou plusieurs acides aminés de la séquence peptidique peut être remplacé par son énantiomère D.

Au titre des analogues chimiques, dans les peptides selon l'invention, une ou plusieurs liaisons amides peptidiques (-CO-NH-) peuvent être remplacées par une liaison isostère telle que : -CH₂NH-, CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH- (cis et trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- et -CH₂SO-. Cette substitution peut être faite par des méthodes bien connues de l'homme du métier (on peut se reporter par exemple à : SPATOLA, Vega Data, Vol.1, issue 3 (1983); SPATOLA, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p.267 (1983). MORLEY.J.-S., Trends Pharm. Sci., 463-468 (1980); HUDSON et al, Int. J. Pept. Prot. Res. 14, 177-185 (1979); SPATOLA et al, Life Sci., 38, 1243-1249 (1986); Hann, J.Chem. Soc. Perkin Trans.I 307-314 (1982); ALMQUIST et al, J. Med. Chem., 23, 1392-1398 (1980); JENNINGS-WHITE et al, EP-45665; HOLLADAY et al, Tetrahedron Lett. 24, 4401-4404 (1983). HRUBY et al, Life Sci. 31, 189-199 (1982)).

Des dérivés des peptides selon l'invention incluent des polymères de ces peptides, plus préférentiellement des dimères de ces peptides via par exemple un groupement thiol de cystéine ou des oligomères par greffage de peptides sur des

polylysines (MAP), ou couplage de ces peptides à des protéines porteuses (BSA, KLH, Toxines, etc.), ou à des chaînes lipidiques.

Les peptides objets de la présente invention peuvent être aisément obtenus par tous moyens connus de l'homme du métier, notamment par voie de

5

synthèse.

L'invention a également pour objet des peptides comprenant une séquence SEQ ID NO : 1 ou des peptides comprenant un fragment fonctionnel de ces peptides, un homologue, un analogue chimique de ces peptides ou un dérivé chimique de ces peptides. En effet, les acides aminés terminaux, du peptide PP comportent, pour

10 l'un, une fonction amine terminale libre, et pour l'autre, une fonction carboxyle terminale libre, ces deux fonctions étant chacune susceptibles d'être engagées dans une liaison peptidique avec l'acide C - terminal, respectivement l'amine N - terminale d'un autre fragment de peptide. De préférence, ces peptides comportent au plus 100 acides aminés, préférentiellement au plus 80 acides aminés, encore plus

15 préférentiellement au plus 60 acides aminés et de façon avantageuse au plus 40 acides aminés.

Le caractère immunogène des polypeptides ou peptides de l'invention peut être vérifié de différentes manières connues de l'homme du métier. Ainsi, les polypeptides peuvent être mis en contact avec des anticorps (ou sérum de

20 sujets infectés), la mise en évidence de complexes antigènes-anticorps indiquant la capacité des polypeptides de l'invention de porter des épitopes ou des fragments immunogènes.

Un autre objet de l'invention réside dans des protéines comprenant un peptide tel que défini ci-dessus, couplé avec une protéine porteuse, comme par

25 exemple la protéine KLH ou la protéine BSA. Ce couplage permet d'augmenter l'immunogénicité du peptide de l'invention. Des protéines porteuses sont illustrées dans les documents US-4,608,251 ; US-5,945,104 ; WO 90/15878.

Le couplage du peptide de l'invention et de la protéine porteuse peut être fait de façon connue par couplage chimique ou par addition de la séquence ADN

30 du peptide avant ou après celle de la protéine porteuse dans un plasmide puis expression et purification de la protéine que l'on désigne du nom de protéine de fusion.

Un autre objet de l'invention concerne des anticorps dirigés spécifiquement contre une protéine, un polypeptide ou un peptide selon l'invention. Il

35 s'agit préférentiellement d'anticorps anti-leptospire, liant un épitope présent dans une protéine, un polypeptide ou un peptide selon l'invention. Les anticorps de l'invention sont préférentiellement spécifiques des leptospires, notamment pathogènes, bien

qu'une liaison plus faible (ou non-spécifique) puisse être observée expérimentalement avec d'autres antigènes.

Les anticorps selon l'invention peuvent être des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Ils sont généralement produits par immunisation d'un animal avec un peptide, un polypeptide ou une protéine, selon l'invention et
5 récupération du sérum, du lait ou de l'œuf s'il s'agit d'oiseaux (pour obtenir les anticorps polyclonaux) ou de cellules du thymus ou de la rate, pour la production d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux.

Les anticorps selon l'invention sont plus préférentiellement des
10 anticorps reconnaissant le peptide PP de séquence SEQ ID NO : 1 telle que définie ci-avant, un fragment fonctionnel de celui-ci, un homologue, un analogue chimique ou un dérivé chimique de celui-ci.

Les anticorps de l'invention possèdent avantageusement la capacité de reconnaître au moins deux souches de leptospire pathogènes appartenant à des
15 sérogroupes différents, plus préférentiellement au moins 3 souches pathogènes de leptospire, en particulier appartenant à des espèces génomiques différentes.

Selon un mode de réalisation particulier, les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux préparés par immunisation d'un animal avec le peptide PP. L'animal peut être un rongeur (rat, souris, gerbille, hamster,
20 cobaye...), un primate, un lapin, un porc, un cheval, un bovin, un oiseau, etc. Les anticorps polyclonaux sont généralement récupérés dans le sérum des animaux immunisés ou les œufs, selon des protocoles connus de l'homme du métier.

Selon un autre mode de réalisation particulier, les anticorps selon l'invention sont des anticorps monoclonaux préparés à partir d'hybridomes obtenus
25 par fusion entre une cellule immortalisée (par exemple un myélome) et une cellule productrice d'anticorps prélevée chez un animal immunisé avec le peptide PP telle que définie ci-avant. L'animal peut être un rongeur (rat, souris, gerbille, hamster, cobaye...), un primate, un lapin, un porc, un cheval, un bovin, un oiseau, etc.

Les anticorps de l'invention, notamment les anticorps monoclonaux,
30 peuvent en outre être humanisés, c'est-à-dire modifiés artificiellement pour comporter des régions de chaînes lourdes ou légères d'origine humaine.

L'invention concerne également des fragments ou dérivés de tels anticorps, par exemple des fragments Fab, F(ab')₂, des ScFv (anticorps simple-chaîne), etc.

35 Comme il sera développé dans la suite du texte, les anticorps de l'invention peuvent être utilisés par exemple pour la détection de souches pathogènes de leptospires ou de produits sécrétés par ces mêmes leptospires dans des échantillons tests (notamment des prélèvements de sang, de lait, de liquide céphalorachidien ou

d'urine), ou pour induire une protection (d'urgence) contre des infections par leptospire.

Un autre objet de l'invention réside dans tout acide nucléique codant un polypeptide, peptide ou une protéine tels que définis ci-avant. Les acides nucléiques peuvent être des ADN ou des ARN, notamment des ADN recombinants, génomiques, synthétiques ou semi-synthétiques ou encore des ARNm, ou des fragments ou dérivés de ceux-ci. Les acides nucléiques peuvent être obtenus à partir de banques, clonés à partir de bactéries leptospires (notamment par PCR), produits par synthèse artificielle en utilisant des synthétiseurs d'acides nucléiques, ou encore préparés en utilisant des combinaisons de ces méthodes (digestions enzymatiques, ligatures, clonage, modifications, etc.). Les acides nucléiques peuvent en outre être modifiés pour améliorer l'usage des codons, éliminer des promoteurs cryptiques, réduire des structures secondaires, etc.

L'invention concerne également des vecteurs comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant. Il peut s'agir d'un vecteur de type plasmide, cosmide, épisome, chromosome artificiel, phage, virus, etc. Il s'agit plus préférentiellement d'un plasmide, par exemple d'un plasmide réplcatif ou intégratif chez les bactéries ou cellules eucaryotes (levures, cellules de mammifères, d'oiseaux, d'insectes, etc.) ou d'un virus recombinant, notamment défectif (tel qu'un poxvirus, un adénovirus, un rétrovirus, un baculovirus, un herpesvirus, etc.).

Les vecteurs plasmidiques peuvent être préparés par les techniques conventionnelles en utilisant des plasmides disponibles dans le commerce, tels que pUC, pBR, pCN, etc.

L'invention concerne aussi toute cellule recombinante comprenant un acide nucléique ou un vecteur tels que définis ci-avant. La cellule recombinante peut être une bactérie (par exemple une souche de E.coli), ou une cellule eucaryote, notamment une levure, une cellule de mammifère, d'oiseau, ou d'insecte, etc. Les cellules recombinantes peuvent être utilisées notamment pour la production des polypeptides de l'invention, ainsi que comme modèles pour la recherche de composés susceptibles de neutraliser ou d'antagoniser l'activité du peptide PP.

L'invention concerne en outre tout organisme transgénique non humain, en particulier, tout mammifère non humain, tout oiseau, ou tout organisme végétal comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant dans ses cellules. Avantagusement, ces organismes transgéniques sont obtenus par recombinaison homologue. De tels mammifères (rongeurs, canins, lapins, chèvre, porc, etc.) et végétaux sont notamment utilisables pour la production des polypeptides de l'invention et pour l'identification de composés à visée thérapeutique ou vaccinale, par exemple.

Un autre objet de la présente invention réside dans des sondes et/ou amorces nucléotidiques, utilisables pour la détection et/ou l'amplification d'acides nucléiques de leptospires, et notamment pour la détection de la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de produit sécrété par celui-ci dans un échantillon test

5 (notamment un produit biologique ou contaminé par un produit biologique).

Les sondes nucléotidiques selon l'invention comprennent avantageusement un acide nucléique tel que défini ci-avant. Elles sont préférentiellement simple-brin, et peuvent être marquées, par exemple par marquage radioactif, enzymatique, fluorescent, chimique, etc. Une sonde selon l'invention

10 comprend préférentiellement une séquence complémentaire de tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou de l'un des peptides selon l'invention tels que définis ci-dessus. Les sondes de l'invention peuvent être utilisées pour détecter la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de produit sécrété par celui-ci dans tout échantillon, notamment un échantillon biologique. En effet, elles sont

15 préférentiellement (i) spécifiques des souches pathogènes de leptospire et (ii) réactives avec des sérovars différents et des espèces génomiques différentes de leptospires pathogènes. Une sonde préférée selon l'invention comprend la séquence complète de la séquence nucléotidique codant PP, ou un fragment de celle-ci.

Les amorces nucléotidiques selon l'invention sont des

20 oligonucléotides, d'une taille généralement inférieure à 40 bases, comprenant la séquence d'un acide nucléique tel que défini ci-avant. Les amorces sont utilisables pour l'amplification d'acides nucléiques de Leptospires, notamment pour l'amplification de la séquence codant PP ou d'une partie de celui-ci, par exemple par réaction PCR.

25 L'invention concerne plus particulièrement tout couple d'amorces permettant l'amplification d'une région de la séquence codant PP tel que défini ci-avant. Préférentiellement, la région amplifiée comporte au moins 50 pb.

Les sondes, amorces ou oligonucléotides de l'invention sont préférentiellement complémentaires d'une région au moins de la séquence codant PP.

30 La complémentarité est généralement parfaite, de manière à assurer une meilleure sélectivité d'hybridation. Toutefois, certains mésappariements peuvent être tolérés. Ces sondes ou oligonucléotides peuvent être synthétisés par toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par clivage à partir des acides nucléiques décrits ci-avant, ou par synthèse artificielle, ou en combinant ces techniques. Les sondes et

35 amorces sont particulièrement utiles pour la détection de la présence de souches pathogènes de leptospires, et/ou le diagnostic de leptospiroses, comme il sera détaillé ci-après.

Diverses équipes travaillent sur l'amélioration des antigènes de diagnostic indirect de la leptospirose, le but étant d'aboutir à des méthodes opérationnelles, facilement utilisables en particulier dans les pays non industrialisés, victimes majeures de ces pathologies. Les produits actuellement proposés sur le
5 marché sont des extraits complexes de cultures de leptospires. Cette complexité reproduit celle des souches vivantes utilisées dans le MAT et n'apporte donc pas d'amélioration sensible en terme de reproductibilité et de praticabilité.

La mise en évidence d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique des souches pathogènes est donc particulièrement avantageuse. La présente invention
10 peut ainsi être utilisée sur le plan diagnostique, vaccinal, thérapeutique et/ou expérimental.

Sur le plan du diagnostic indirect, compte tenu de sa présence dans ou de sa sécrétion par les souches pathogènes, le peptide PP de l'invention peut être utilisé comme motif antigénique capable de mettre en évidence des anticorps produits
15 lors d'une infection par une souche pathogène, quel que soit son sérotype d'appartenance. Ceci permet donc que le diagnostic expérimental de la leptospirose puisse être assuré par de nombreux laboratoires disposant d'un équipement ordinaire (exemple ELISA ou dot) alors que le MAT exige en entretien de cultures vivantes et que sa standardisation, de ce fait, est très difficile.

Un objet particulier de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un polypeptide, peptide ou d'une protéine tels que définis ci-avant pour détecter *in vitro* la présence d'anticorps anti-leptospire dans un échantillon biologique test (notamment un échantillon biologique tel que sang, sérum, lait, urine, tissu, etc. ou non biologique tel que eau, etc.). Un autre objet de l'invention réside dans une méthode *in vitro* de
25 détection de la présence d'anticorps anti-leptospire dans un échantillon test, cette méthode comprenant la mise en contact de cet échantillon (ou une dilution) avec un polypeptide, peptide ou une protéine tels que définis ci-avant, et la mise en évidence de la formation de complexes antigène-anticorps.

Sur le plan du diagnostic direct, les anticorps (ou fragments ou
30 dérivés d'anticorps) selon l'invention, notamment les anticorps monoclonaux de l'invention, permettent la mise en évidence directe de l'agent pathogène ou de produits sécrétés présents dans un échantillon test (tel qu'un prélèvement biologique ou un autre type d'échantillon tel que de l'eau). La mise en évidence peut être réalisée par toute méthode immunologique connue de l'homme du métier, telle que par ELISA
35 capture, RIA, essais directs ou sandwich, etc., ou par révélation immunologique de ce peptide dans les prélèvements pathologiques ou non.

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un anticorps (ou fragment ou dérivés d'anticorps) selon l'invention, notamment d'un ou

plusieurs anticorps monoclonaux de l'invention, pour la détection de la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de ses produits sécrétés dans un échantillon, notamment biologique. Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de détection de la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de ses produits sécrétés dans un échantillon, comprenant la mise en contact de cet échantillon (ou une dilution, ou une concentration) avec un anticorps (ou fragment ou dérivés d'anticorps) selon l'invention, et la mise en évidence de la formation de complexes antigène-anticorps.

Pour ces utilisations, les polypeptides, peptides, protéines et anticorps peuvent être utilisés sous forme soluble, ou immobilisés sur des supports solides ou semi-solides, de type filtre, silice, verre, plaque, bille, etc. L'utilisation sous forme immobilisée permet avantageusement de simplifier la détection ou le diagnostic expérimental de la leptospirose. Ces composés peuvent en outre être marqués, par exemple au moyen de marqueurs fluorescents, enzymatiques, biologiques ou radioactifs. Comme indiqué ci-avant, la révélation de complexes antigène-anticorps peut également être réalisée au moyen d'un anticorps supplémentaire marqué, ou selon les techniques immunologiques connues (ELISA, RIA, sandwich, capture, etc.).

Une autre méthode de détection (ou dépistage) selon l'invention réside dans la mise en contact d'un échantillon test avec une sonde nucléotidique de l'invention, et la mise en évidence d'une hybridation entre ladite sonde et ledit échantillon. Plus préférentiellement, l'échantillon test est traité préalablement de manière à rendre les acides nucléiques qu'il contient accessibles à une réaction d'hybridation. Le traitement peut consister à casser les membranes cellulaires, par exemple par traitement chimique (détergent) et/ou mécanique (ultra son, congélation-décongélation, etc.). A ce traitement, peuvent s'ajouter des méthodes de concentration (filtration, centrifugation, etc.) des prélèvements, notamment non biologiques tels que des échantillons d'eau. Dans un mode particulier de mise en œuvre, l'échantillon, notamment biologique, ainsi traité est soumis à une réaction d'amplification, au moyen d'amorces de l'invention, préalablement à la réaction d'hybridation avec la sonde. L'amplification peut être réalisée dans des conditions conventionnelles. L'hybridation peut être réalisée sur des supports, sur lesquels la sonde est immobilisée (filtres, verre, silice, etc.). Les conditions de stringence de l'hybridation peuvent être ajustées par l'homme du métier, en adaptant la température et/ou la salinité des milieux.

L'invention concerne en outre un kit pour la mise en œuvre des procédés de l'invention, comprenant une sonde ou un oligonucléotide ou un couple d'amorces tels que décrits ci-avant. Les kits de l'invention comprennent avantageusement les réactifs appropriés à une réaction d'amplification et/ou

d'hybridation, et, éventuellement, un support pour de telles réactions (filtres, membranes, chips, etc.).

La présente invention est également utilisable sur le plan thérapeutique et préventif. En effet, bien que le mode d'action pathogénique du peptide PP ne soit pas encore défini, la présente demande montre qu'il est capable d'induire une protection. L'administration des anticorps dirigés contre ce peptide, qu'ils soient d'origine poly ou monoclonale permet de neutraliser l'impact pathogénique des leptospires chez l'individu en cours d'évolution et donc d'améliorer le pronostic de cette maladie. De même, l'administration d'un polypeptide, peptide ou d'une protéine de l'invention, éventuellement sous forme inactivée, ou d'un acide nucléique ou vecteur correspondant, permet d'induire une réponse immune protectrice contre ces agents infectieux ou leurs effets.

L'efficacité des peptides de l'invention dans la détection précoce des leptospires pathogènes et l'induction d'une protection immunitaire contre ces mêmes leptospires est particulièrement remarquable, en particulier, du fait que la protéine PPL dont ils sont issus ne permet pas d'obtenir une immunisation de façon directe, sans passer par l'expression dans un adénovirus, et qu'elle ne permet pas non plus de détecter de façon précoce et spécifique la présence de souches de leptospires pathogènes dans un organisme humain ou animal.

En outre, il est bien connu de l'homme du métier que les peptides sont en règle générale faiblement immunogènes.

Dans des exemples qui sont destinés à illustrer l'invention, les propriétés remarquables suivantes du peptide PP sont illustrées :

Le peptide constitué de cette séquence ID N°1 est reconnu en ELISA par plusieurs anticorps monoclonaux contre la protéine PPL et en particulier 4D4H4E5 et 6E5A2F2 (Demande Internationale WO01/59123, Exemple 2).

On a également montré que le peptide PP, qu'il soit couplé ou non à une protéine porteuse, est très immunogène sur le modèle souris, lapin (Exemple 3) et gerbille (Exemple 7).

Dans un troisième temps, la réponse anticorps dirigée contre le peptide PP a été analysée sur les sérums de gerbilles immunisées par l'adénovirus-PPL. Une corrélation peut être observée entre la réponse immunitaire dirigée contre le peptide PP et la protection des animaux suite à l'immunisation par PPL via l'adénovirus ce qui conforte l'hypothèse d'un effet protecteur associé à la séquence de ce peptide (Exemple 6).

Dans un quatrième temps, le peptide PP a été couplé à la protéine porteuse KLH et une protection efficace contre une épreuve virulente a été observée sur la gerbille immunisée par PP-KLH (Exemple 7). Le peptide PP présente au moins

un épitope protecteur dans sa séquence. Le peptide seul a permis d'induire une protection significative contre une épreuve virulente (exemple 7).

Dans un cinquième temps, l'efficacité discriminante du peptide PP comme antigène de diagnostic pour la leptospirose a été évaluée sur plusieurs espèces (homme, chien, bovin, cheval). Quelle que soit l'espèce considérée, le peptide PP se révèle être un antigène capable de mettre en évidence une réponse immunitaire spécifique d'une infection par les leptospires pathogènes, et en particulier en phase précoce (Exemple 4).

Enfin, des essais de vaccination ont montré l'effet protecteur du peptide PP chez le chien (Exemple 8).

Ces résultats démontrent que si les antigènes lipopolyosidiques sont bien le support d'une protection efficace vis-à-vis d'une infection homologue, point de départ de la constitution des préparations vaccinales employées actuellement tant chez l'homme que chez l'animal, le peptide PP, employé seul, est capable d'induire une protection croisée entre sérogroupes différents de l'espèce *Leptospira interrogans ss* (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Autumnalis). La protection hétérologue est également induite entre espèces génomiques différentes de l'ancienne espèce *Leptospira interrogans sl* (ici *L. borgpetersenii* et *interrogans ss*), alors qu'il est absent de l'ancienne espèce saprophyte *Leptospira biflexa sl*.

La présente invention concerne donc l'utilisation du peptide PP, de ses fragments de synthèse ou naturels, de ses dérivés chimiques quels qu'ils soient, de ses homologues, de ses analogues chimiques, utilisés seuls ou associés à d'autres protéines ou fractions lipopolyosidiques dérivées de leptospires, ou à des adjuvants de l'immunité quelle que soit leur nature, pour la préparation d'une composition vaccinale à usage vétérinaire ou humain, notamment pour la préparation d'une composition destinée à induire une réponse immune protectrice contre des espèces et des sérovars différents de leptospires pathogènes.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique, notamment un vaccin, comprenant un polypeptide ou un acide nucléique tels que définis ci-avant.

L'invention a encore pour objet une composition comprenant un ou plusieurs anticorps tels que décrits ci-avant, notamment pour induire une protection.

Les compositions immunogènes, vaccins ou anticorps de l'invention peuvent être utilisés sous forme injectable ou per os ou transcutanée, par exemple en association avec des véhicules acceptables sur le plan pharmaceutique ou vétérinaire, ou avec des adjuvants. Les quantités d'immunogènes administrées, et la fréquence ou le nombre des administrations peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du sujet, du stade d'évolution de l'injection, etc. Typiquement, une ou deux injections,

à 2 semaines d'intervalle, sont réalisées, avec des quantités adaptés à l'espèce par exemple 30 µg de peptide couplé à la protéine porteuse selon l'invention. Des injections supplémentaires peuvent être envisagées, ou des quantités supérieures peuvent être administrées, notamment dans le cas d'administrations orales.

5 Les compositions immunogènes ou des vaccins de l'invention présentent notamment les avantages suivants :

Efficacité : Induction d'une protection croisée évitant l'accumulation de préparations antigéniques différentes d'efficacité partielle afin de prévenir l'infection par les différentes souches infectantes présentes dans un pays donné pour
10 une espèce donnée.

Innocuité : L'utilisation d'un peptide de l'invention (couplé ou non à une protéine porteuse, ou des polypeptides, anticorps et acides nucléiques) évite d'introduire chez l'individu vacciné de nombreux antigènes non nécessaires à la protection, donc pour le moins inutiles, voire dangereux lors d'utilisations répétées. On
15 pense ainsi que l'uvéite récidivante du cheval (pouvant aboutir à la cécité de l'animal) est induite par une réponse immunitaire post infectieuse due à des protéines de leptospires ayant une composition proche de certaines protéines structurales de l'œil du cheval. Par ailleurs, il semble que chez l'Homme les vaccinations répétées sont de moins en moins bien tolérées au cours du temps. De plus, aucune donnée de
20 pharmacovigilance à long terme n'est disponible.

Les compositions d'anticorps (polyclonaux, monoclonaux humanisés ou non) peuvent avantageusement éviter en urgence et passivement une évolution grave et/ou létale d'une leptospirose déclarée chez l'homme ou l'animal.

Compatibilité avec les mesures de prophylaxie sanitaire :
25 actuellement, il est impossible de différencier les anticorps post-vaccinaux des anticorps post-infectieux, la production d'anticorps agglutinants étant obtenue dans les deux cas. Ce vaccin employé dans les grandes espèces de production (il n'en existe pas actuellement en France et ceux existant à l'étranger ont une efficacité difficile à démontrer) permettrait de mettre en œuvre une prophylaxie médicale permettant
30 malgré tout le dépistage de l'infection sauvage et donc les qualifications de cheptels indemnes, qualifications valorisantes à l'exportation.

Limitation de l'usage des antibiotiques en élevage : l'absence de possibilités d'éradication des leptospires (entretenus dans l'environnement par de nombreuses espèces d'animaux réservoirs de la faune sauvage) oblige actuellement à
35 mettre en œuvre un traitement antibiotique élargi à l'ensemble du troupeau quand des troubles cliniques ou des pertes économiques sont reconnus liés à l'infection leptospirosique. Ceci contribue donc à l'utilisation intensive des antibiotiques en élevage, usage discuté en terme de retombées pour la santé publique.

La production industrielle d'un tel vaccin devrait enfin être simplifiée par rapport aux vaccins de l'art antérieur puisqu'il n'est pas nécessaire de modifier la composition antigénique de la préparation vaccinale en fonction de l'espèce, ni des conditions épidémiologiques spécifiques des zones géographiques où elle serait appliquée.

L'invention concerne aussi les polypeptides, protéines et peptides tels que définis ci-avant, sous forme atténuée, c'est-à-dire conservant les propriétés immunogènes et essentiellement dépourvus d'autre activité biologique.

L'invention concerne également l'utilisation des acides nucléiques ou vecteurs tels que décrits ci-avant pour la production *in vitro* ou *ex vivo* des polypeptides, protéines et peptides de l'invention, quelles que soient les méthodes de recombinaison génétique employées : animaux transgéniques, bactéries, cellules eucaryotes, végétales, plasmides, virus, extraction de milieux de culture acellulaire etc. Les techniques de production de protéines recombinantes sont bien connues de l'homme du métier, et peuvent être appliquées à la présente invention (promoteurs forts, inductibles, signaux de terminaison, techniques de transfection, etc.).

Description des outils : identification d'un peptide (PP) à des fins d'utilisation comme vaccin, diagnostic et thérapeutique

La présente invention sera décrite en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs

Légende des figures :

Figure 1 : Réponse anticorps IgG₁ de 5 souris immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH pour l'essai 1 et 2 exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

Figure 2 : Réponse anticorps IgG_{2A} de 5 souris immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH pour l'essai 1 et 2 exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

Figure 3 : Réponse anticorps IgG de lapin immunisé par le peptide PP exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

Figure 4 : Comparaison de la Réponse anticorps IgM et IgG de sérums provenant de malades humains non atteints de leptospirose (confirmée par le MAT) mais atteints de la maladie de Lyme pour deux d'entre eux (sérum 151358 et 153272) contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL exprimée en densité optique (DO).

Figure 5 : Réponse anticorps IgM et IgG de 5 sérums provenant de malades humains atteints de leptospirose confirmée ou non par le MAT contre le peptide PP exprimée en densité optique (DO).

Figure 6 : Réponse comparée PP et PPL, soit IgM, soit IgG, pour des sérums provenant de 4 chiens SPF dont trois sont vaccinés contre la leptospirose (CN V) exprimée en densité optique (DO).

5 Figure 7 : Réponse anticorps IgM et IgG de 7 sérums provenant de chiens, suspects cliniques (leptospirose confirmée par le MAT) comparée à celle de 3 chiens sains SPF vaccinés (3039, 3051, 3058) contre le peptide PP exprimée en densité optique (DO) ; les N° 210749 et 210750 proviennent d'un même animal prélevé à 4 jours d'intervalle (CN = chien).

10 Figure 8 : Réponse anticorps IgG de 4 sérums bovins issus de cheptels suspectés atteints de leptospirose contre le peptide PP exprimée en densité optique.

Figure 9 : Réponse anticorps IgG de 6 sérums équins contre le peptide PP exprimée en densité optique.

15 Figure 10 : Cinétique de la réponse anticorps contre le peptide PP exprimée en densité optique corrigée des gerbilles immunisées via l'adénovirus.

Figure 11 : Cinétique de la réponse anticorps IgG contre le peptide PP exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution (A) ou du temps (B) de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH.

20 Figure 12 : Courbe de survie de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH et soumises à une épreuve virulente (EV) de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola.

Figure 13 : Courbe de survie de gerbilles immunisées par PP-KLH ou PP et soumises à une EV de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola.

25 Figure 14 : Calendrier de l'essai de vaccination par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH chez le chien avec épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

30 Figure 15 : Evolution de l'augmentation du poids des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) avant épreuve virulente

Figure 16 : Evolution de l'augmentation de la température des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

35 Figure 17 : Evolution de la variation des plaquettes des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

Figure 18 : Evolution quantitative de la variation des globules blancs des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

5 Figure 19 : Evolution quantitative de la variation des lymphocytes des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

Figure 20 : Evolution quantitative de la variation des monocytes des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

10 Figure 21 : Evolution de l'augmentation de la créatinine des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

Figure 22 : Evolution de l'augmentation de l'urée des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

15 Figure 23 : Evolution du coefficient cumulé pour les cultures et PCR des lots des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

20

Légende des tableaux

Tableau 1 : Titre MAT et EIA de 5 sérums provenant de malades humains atteints ou non de leptospirose.

25 Tableau 2 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL avec l'adjuvant de Freund après épreuve virulente canicola.

Tableau 3 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL adjuvée par l'hydroxyde d'alumine et le QS 21 après épreuve virulente canicola.

30 Tableau 4 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH après épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl canicola.

Tableau 5 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH après épreuve virulente canicola 10⁻².

35 Tableau 6 : Analyse statistique des essais vaccinations par le peptide PP couplé ou non selon le test de Logrank.

Tableau 7 : Résultats des cultures effectuées sur les prélèvements de plasma, d'urines et de reins des 6 chiens témoins et des 6 chiens vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola.

5 Tableau 8 : Résultats PCR sur les prélèvements plasma, urines et reins des 6 chiens témoins et des 6 chiens vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar

10 Légendes des séquences

Seq ID N° 1 : séquence peptidique PP

Exemple 1 : Synthèse du peptide PP

15 Le peptide PP représenté dans la séquence SEQ ID N°1, est un peptide de 25 acides aminés qui correspond au fragment aa153-aa177 de la protéine PPL de *Leptospira interrogans* sl.

Le peptide ID N°1 de 25 acides aminés a été synthétisé par Neosystem.

Le peptide brut est purifié par HPLC.

20 L'homogénéité du peptide purifié est vérifiée en HPLC et la structure théorique est confirmée par mesure de la masse de ce peptide en spectrométrie de masse de type ES-MS, par rapport à celle calculée à partir de la séquence théorique en acides aminés de ce peptide.

25 Exemple 2 : identification du peptide PP contre des anticorps monoclonaux

Le peptide ID N°1 a été utilisé en ELISA. Il a été utilisé comme antigène d'adsorption (protocole diagnostic) avec comme anticorps primaires, différents anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine PPL, en particulier deux anticorps monoclonaux 6E5A2F2 et 4D4H4E5 et des sérums de gerbilles éprouvées par un challenge *Leptospira interrogans* ss sérovar canicola. Les deux anticorps monoclonaux ont reconnu ce peptide ce qui démontre qu'il possède un ou des épitopes immunogènes de la protéine PPL. Par ailleurs, les sérums polyclonaux de gerbilles ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre ce peptide dans une phase précoce après infection par des leptospires pathogènes chez la gerbille.

35 Exemple 3 : Immunogénicité du peptide PP

3-1 Immunogénicité du peptide PP couplé à la protéine porteuse

KLH

Couplage chimique pour obtenir PP-KLH

Dans cet exemple, le peptide utilisé correspond au peptide PP (SEQ ID NO : 1) auquel est ajouté un cystéine en position N-terminal. Le réactif hétérobifonctionnel, sulfo-m-Maleimidobenzoyl-N-hydrosuccimide ester (sulfo-MBS, Pierce) utilisé permet une activation des fonctions amine libres de la protéine porteuse
5 KLH (keyhole-limpet-haemocyanin, Pierce), puis un couplage du peptide via la réaction du groupement sulfhydryl de la cystéine ajoutée à l'extrémité N-terminale du peptide avec la partie maléimide du réactif sulfo-MBS.

Brièvement la protéine porteuse KLH solubilisée dans de l'eau à une concentration de 10 mg/ml est activée à l'aide du réactif sulfo-MBS dilué dans du
10 tampon de couplage (Phosphate sodique 83 mM, pH = 7,2, NaCl 0,9 mM, EDTA 0,1 M) à une concentration finale de 2 mg/ml. Celui-ci est ajouté à raison de 1 mg de réactif pour 10 mg de KLH, puis l'ensemble est placé sous agitation pendant 1 h à l'obscurité à une température de 15 à 25°C. La protéine KLH est déssalée sur colonne NAP5 équilibrée par le tampon de couplage. L'élution de la protéine est réalisée à
15 l'aide de ce tampon. Les fractions contenant la protéine KLH activée sont rassemblées. Pour le couplage, 8.5 mg de peptide (dans le tampon précédent à une concentration de 2 mg/ml) sont ajoutés à 10 mg de KLH (concentration de l'ordre de 5 mg/ml) dans un volume final de 6 ml. L'ensemble est placé sous agitation pendant 2 heures à une température de 15 à 25°C et à l'obscurité. Le conjugué est ensuite dialysé contre un
20 tampon PBS (Phosphate sodique 20 mM pH = 7,4, NaCl 130 mM) : 3 dialyses successives de 2 fois 1 heure puis une nuit à 4°C avant dosage protéique. La préparation est ensuite répartie, à raison de 100 µg par tube eppendorf et congelée à -80°C.

Réponse anticorps contre le peptide PP chez la souris

25 Un protocole d'immunisation a été mis en œuvre pour évaluer la réponse immunitaire contre le peptide PP couplé à la KLH.

Un lot de 5 souris a été constitué. Deux injections ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. La 1^{ère} injection est constituée de 10 µg de peptide PP couplé à la KLH avec l'adjuvant complet de Freund
30 sous un volume de 200 µl (v/v). La 2^{nde} injection est constituée de 10 µg de peptide PP couplé à la KLH avec l'adjuvant incomplet de Freund sous un volume de 200 µl (v/v). Cet essai a été réalisé deux fois.

En parallèle, un lot de 5 souris ne recevant rien est utilisé comme témoin.

35 Une prise de sang a été réalisée deux semaines après la seconde injection pour contrôle sérologique.

Les anticorps anti-PP produits chez les souris sont dosés par une technique ELISA soit sur des prélèvements sérologiques individuels soit sur des pools

de plusieurs sérums. L'adsorption de l'antigène PP s'effectue dans les plaques Immulon 4 (Dynatech) à raison de 500 ng de PP par puits dilué dans du tampon carbonate de sodium 10 mM, pH = 9,4.

Après une nuit à 4°C, les plaques sont lavées par du PBS contenant
5 0,2 % tween₂₀ puis saturées par une solution de BSA à 1 % dans du TNE (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) pendant 60 min à 37°C. Après 3 lavages avec PBS tween, cent µl de sérum dilués dans du TNE contenant 0.1% de BSA sont déposés dans chaque cupule et incubés 60 min à 37°C. Après 5 lavages, les antiglobulines IgG1 ou IgG₂A de souris couplées à la peroxydase diluées au 1/5000
10 dans la tampon TNE-0.1% BSA sont ajoutées à raison de 100 µl par puits et placées 60 min à 37°C. Après 5 lavages, la révélation est réalisée par adjonction de 100 µl par puits d'un tampon [citrate/ABTS] contenant H₂O₂. Après 10 min à une température de 15-25°C, la réaction est arrêtée par ajout d'une solution H₂O/DMF (v/v) contenant 5 % de SDS à raison de 100 µl par cupule. La réaction colorée est lue au
15 spectrophotomètre à 405 nm.

Les résultats de la réponse anticorps IgG₁ anti-PP exprimée en DO corrigée des essais d'immunisation 1 et 2 par le peptide PP couplé à la KLH sont présentés dans figure 1. La DO corrigée correspond à la DO de l'animal immunisé moins la DO du pools des animaux témoins.

20 On constate une grande homogénéité de la réponse anticorps anti-PP chez les souris. Par ailleurs, cette réponse est très élevée puisque les sérums dilués au 1/8000 et au 1/16000 donnent une DO corrigée entre 0,8 et 1,2 (optimum de lecture).

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'essai 2.

Les résultats de la réponse anticorps IgG_{2A} anti-PP exprimée en DO
25 corrigée des essais d'immunisation 1 et 2 par le peptide PP couplé à la KLH sont présentés dans la figure 2.

On constate une certaine homogénéité de la réponse anticorps IgG_{2A} anti-PP chez les souris exceptée la souris 5 dans l'essai 1. Par ailleurs cette réponse est élevée mais moins importante que la réponse IgG₁ anti-PP.

30 Des résultats similaires ont été obtenus pour l'essai 2, l'homogénéité de la réponse anticorps étant cependant plus faible.

Au bilan, l'immunisation de souris par le peptide PP couplé à la KLH induit une réponse anti-PP IgG₁ et IgG_{2A} à la fois élevée et homogène.

Le peptide PP couplé à la protéine KLH est donc très immunogène.

35 3-2 Immunogénicité du peptide PP non couplé

Pour tester l'immunogénicité du peptide PP seul, une immunisation par le peptide PP sur le modèle lapin a été effectué avec adjonction à chaque injection de l'adjuvant incomplet de Freund.

Plus précisément, deux injections de 400 µg de peptide PP avec l'adjuvant incomplet de Freund (v/v) ont été réalisées sous un volume total de 2 ml.

Les deux injections ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. Le sérum de lapin a été récupéré deux semaines après la
5 seconde injection. Un titrage des anticorps anti-PP a été effectué sur ce sérum.

Les anticorps anti-PP ont été dosés chez le lapin par la technique ELISA décrite ci-dessus avec une antiglobuline anti-lapin biotinylée (BioAtlantic) au 1/3000 et comme révélateur de la streptavidine couplée à la peroxydase (RPN1231, Amersham pharmacia biotech).

10 Les résultats de la réponse anticorps IgG anti-PP exprimée en DO corrigée (DO à J28 donc après la seconde immunisation moins la DO à J0) de l'essai d'immunisation par le peptide PP sont présentés dans la figure 3.

La réponse anticorps contre le peptide PP est très élevée puisque à une dilution de 102400, une réponse contre le peptide PP est toujours détectable. Le
15 peptide PP seul est très immunogène.

Bilan

Le peptide PP qu'il soit couplé ou non à une protéine porteuse est capable d'induire une forte réponse sérologique sur différents modèles animaux. Donc le peptide PP est très immunogène.

20 Exemple 4 : Utilisation diagnostique du peptide PP

Pour tester l'efficacité discriminante du peptide PP comme antigène de diagnostic pour la leptospirose, nous avons étudié des sérums issus d'humains, et d'animaux de différentes espèces vaccinées ou non, atteintes ou non de leptospirose clinique.

25 Les sérums ont été sélectionnés en fonction des commémoratifs cliniques mais aussi en fonction de leur réponse au test de référence (MAT).

Les espèces animales testées sont au nombre de 4 et représentent les animaux de compagnie ou de production les plus touchés par la leptospirose :

- le chien
- 30 ▪ le bovin
- le cheval
- le porc

Technique ELISA

35 Les anticorps anti-PP ont été dosés par la technique ELISA décrite ci-dessus avec les antiglobulines couplées à la peroxydase choisies en fonction de l'espèce dont est issu le sérum analysé (anti-humain, anti-chien, anti-bovin, anti-cheval ou anti-porc (Jackson)).

Les anticorps anti-PPL ont été dosés par la même technique.

Résultats

4-1 Humains IgG et IgM (ref fig 4)

L'étude a été réalisée sur quarante sérums humains :

- 10 de ces sérums sont des cas non atteints de leptospirose mais confirmée lyme positif.
- Trente de ces sérums proviennent de l'institut Pasteur. Les tests MAT et EIA ont été réalisés par le CNR des leptospires de l'Institut Pasteur de Paris. Les résultats, titre en MAT et en EIA (IgM) de cinq de ces sérums représentatifs des trente sont présentés dans le tableau 1 dont 4 seulement la leptospirose a été sérologiquement confirmée par l'Institut Pasteur.

Dans tous les cas de figure, le témoin négatif correspond à un pool de sérums d'individus en bonne santé (avant vaccination) et contrôlés individuellement en MAT.

	sérums				
	1	2	21	24	27
Anticorps de classe IgM (EIA)*	3200	négatif	3200	1600	1600
MAT **					
<i>L. interrogans</i> australis	100	100	400	Négatif	400
<i>L. interrogans</i> autumnalis	100	Négatif	50	50	100
<i>L. interrogans</i> bataviae	Négatif	Négatif	Négatif	100	50
<i>L. interrogans</i> canicola	800	Négatif	400	400	800
<i>L. interrogans</i> castellonis	200	Négatif	50	6400	Négatif
<i>L. interrogans</i> cynopteri	800	Négatif	3200	400	400
<i>L. interrogans</i> grippotyphosa	Négatif	Négatif	Négatif	50	50
<i>L. interrogans</i> hardjo	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>L. interrogans</i> hebdomadis	200	Négatif	400	Négatif	400
<i>L. interrogans</i> icterohaemorrhagiae	3200	50	800	1/400	800
<i>L. interrogans</i> panama	Négatif	Négatif	50	Négatif	Négatif
<i>L. interrogans</i> pomona	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	50
<i>L. interrogans</i> pyrogenes	400	Négatif	Négatif	400	Négatif
<i>L. interrogans</i> sejroe	100	Négatif	200	50	800
<i>L. interrogans</i> tarassovi	200	Négatif	100	50	400
Leptospirose	Sérologiquement confirmée	Négatif	Sérologiquement confirmée		

*limite 400

**limite 100

Tableau 1: Titre MAT et EIA de 5 sérums provenant de malades humains suspectés de leptospirose clinique

Analyse de la spécificité des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL sur des sérums humains non atteints de leptospirose

5 Afin d'estimer les potentielles réponses croisées entre spirochètes, dans un premier temps, des sérologies ont été effectuées sur onze sérums humains dont dix proviennent de cas atteints de la maladie de Lyme ; les réponses anticorps IgM et IgG ont été analysées contre le peptide PP mais aussi contre la protéine recombinante PPL.

10 Les résultats de la réponse IgG et IgM dirigée contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL de 3 sérums représentatifs sont représentés dans la figure 4 en comparaison du témoin négatif (pool de sérums négatifs en MAT d'individus sains).

Réponse contre la protéine recombinante PPL

15 Compte tenu du témoin et du sérum2, le sérum 153 272 du cas confirmé lyme positif présente une réponse sérologique IgM significative contre la protéine recombinante PPL.

Par ailleurs, une réponse sérologique IgG importante contre la protéine recombinante est détectée pour le témoin mais aussi pour les sérums négatifs pour la leptospirose ne permettant pas un usage sérologique discriminant de PPL.

Réponse contre le peptide PP

20 Ces résultats montrent que pour des cas confirmés de maladie de Lyme et indemnes de leptospirose (sérums 151358 et 153272), la réponse IgM et IgG contre le peptide PP est du même ordre que celle du témoin (pool de sérums).

Analyse des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP sur des sérums d'humains atteint ou non de leptospirose

25 Dans un second temps, afin d'apprécier la sensibilité, la réponse IgG et IGM dirigée contre le peptide PP a été analysée sur trente sérums humains atteints de leptospirose (provenant de l'institut Pasteur).

30 Les résultats de la réponse IgG et IgM dirigée contre le peptide PP de 5 sérums représentatifs (voir tableau 1) sont représentés dans la figure 5 en comparaison du même témoin négatif.

Chiens IgG et IgM

35 Chiens SPF vaccinés : Analyse de la spécificité des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL sur des sérums de chiens SPF vaccinés ou non contre la leptospirose

Dans un premier temps, des sérologies ont été effectuées sur des sérums de chiens SPF vaccinés contre la leptospirose ou non. Le test MAT a été réalisé parallèlement dans le laboratoire.

Les résultats de la réponse IgG et IgM dirigée contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL de ces sérums sont représentés dans la figure 6 en comparaison du témoin négatif (pool de sérums provenant de chiens SPF non vaccinés).

Réponse contre la protéine recombinante PPL

5 Compte tenu du témoin (chiens SPF non vaccinés), la réponse sérologique IgM anti-PPL des chiens vaccinés est significativement plus intense.

Par ailleurs, la réponse sérologique IgG élevée contre la protéine recombinante du témoin négatif ne permet pas d'estimer la réponse vaccinale spécifique.

Réponse contre le peptide PP

10 Les résultats de l'étude de la réponse anticorps IgG et IgM dirigée contre le peptide PP des chiens vaccinés sont présentés dans la figure 6. Les sérums de trois chiens SPF vaccinés par différents vaccins contre la leptospirose (N° de sérum : 3039, 3051, 3058) développent une réponse IgM du même ordre que celle du témoin négatif (pool de sérums). La réponse IgG anti-PP quant à elle est plus forte que celle du témoin
15 mais reste faible puisque inférieure à une DO de 0,25.

Chiens tout venants suspectés de leptospirose clinique par comparaison aux chiens SPF : analyse des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP sur des sérums de chiens tout venants atteints ou non de leptospirose (qu'ils soient vaccinés ou non)

20 L'étude a été réalisée sur plus de quarante sérums canins. Les réponses anticorps IgM et IgG dirigées contre l'antigène PP sont présentées pour 10 chiens représentatifs des différents cas que l'on peut observer.

Le test MAT a été réalisé parallèlement dans le laboratoire. Les résultats de ces réponses anticorps anti-PP sur ces 10 sérums canins sont présentés dans la figure 7
25 en comparaison d'un témoin négatif.

Les chiens suspects de leptospirose clinique non vaccinés

Les résultats de l'étude de la réponse anticorps IgG et IgM dirigée contre le peptide PP des chiens non vaccinés sont présentés dans la figure 7A. Le témoin négatif correspond au sérum de chiens SPF et ne présente pas de réponse anticorps IgM et IgG
30 significatives. Les sérums 210749 et 210750 ont été prélevés sur le même chien à 4 jours de différence. Le titre MAT du premier prélèvement est négatif alors que la réponse anticorps IgM anti-PP est très élevée (DO>0,6) et la réponse IgG anti-PP débute puisqu'on atteint une DO de 0,3 en fin d'évolution clinique. On constate une séroconversion par le MAT (titre = 160) et parallèlement, la réponse IgM anti-PP a diminué pour laisser place à
35 une réponse IgG anti-PP très élevée (DO>0,9).

Le peptide PP peut donc s'avérer très utile pour les diagnostics de leptospirose et plus particulièrement en phase précoce car une réponse anticorps IgM anti-PP peut être détectée alors que le titre MAT est encore négatif.

Le sérum 210845 correspond à un chien atteint de leptospirose confirmée. On peut observer une réponse anticorps IgM et IgG anti-PP élevées et de même intensité.

Les chiens vaccinés

5 Les résultats de l'étude de la réponse anticorps IgG et IgM dirigée contre le peptide PP des chiens vaccinés sont présentés dans la figure 7B avec la référence des témoins SPF vaccinés (N° de sérum : 3039, 3051, 3058)

10 Le sérum 211466 correspond à un chien présentant des signes cliniques de leptospirose, cependant le titre MAT de ce sérum est non significatif. La réponse anticorps IgM anti-PP est très élevée ($DO > 0,7$) alors que la réponse IgG anti-PP est non significative. Le chien est donc bien probablement atteint de leptospirose en phase très précoce. La réponse importante en IgM anti-PP est en faveur d'un début de réponse sérologique (attesté par le titre modéré en MAT).

15 Les sérums 21463 et 21457 correspondent à des chiens présentant des signes cliniques de leptospirose confirmée en MAT de durée d'évolution plus longue que le cas précédent. Ils présentent une forte réponse en IgM et IgG dirigée contre le peptide PP.

Bilan :

20 Le peptide PP se révèle un antigène discriminant de l'infection leptospirosique que les chiens soient vaccinés ou non. L'utilisation de l'antigène PP permet de détecter des cas de leptospiroses en phase précoce, l'état vaccinal antérieur n'empêchant pas l'interprétation diagnostique contrairement au MAT pour lequel l'interprétation de titres faibles est sujette à caution.

Bovins IgG

25 L'étude a été réalisée sur trente sérums bovins.

Les résultats des réponses anticorps anti-PP sur 4 sérums bovins représentatifs des trente analysés sont présentés dans la figure 8 en comparaison d'un témoin négatif.

30 Si tous les animaux des cheptels bovins (et autres ruminants et porcs) sont exposés à l'infection leptospirosique, peu d'animaux expriment cliniquement la maladie. Néanmoins, la cohorte est soumise au risque infectieux et tous les animaux développent une réponse immunitaire, parfois difficile à détecter en MAT, d'où la nécessité de diagnostic de groupe.

35 Les résultats présentés proviennent donc d'animaux n'ayant pas nécessairement avorté eux-mêmes mais provenant de cheptels dans lesquels des avortements liés à la leptospirose ont été suspectés car non reliés à des étiologies classiques et par ailleurs fortement suspectés de leptospirose sur les résultats globaux du groupe en MAT.

La réponse IgG vis à vis de PP a été étudiée sur 30 sérums de bovins provenant de 7 cheptels différents, par comparaison d'un sérum témoin provenant d'un pool de sérums de cheptels composés d'animaux tous négatifs en MAT. Les résultats de quatre sérums représentatifs sont présentés dans la figure 8. Les sérums 1398, 1399 et 1401 sont des sérums positifs en MAT. Le sérum 4126 provient d'un cheptel comportant des animaux positifs en MAT, mais est lui-même négatif à ce test alors que la réponse est très forte vis à vis de PP.

Bilan : ces résultats confirment l'intérêt du peptide en tant qu'antigène capable de mettre en évidence une réponse immunitaire à une infection par les leptospires.

Cheval IgG

Les résultats des réponses anticorps anti-PP sur 6 sérums équins sont présentés dans la figure 9 en comparaison d'un témoin négatif.

Pour cette espèce, le choix s'est porté sur une catégorie particulière d'animaux : les animaux atteints d'uvéite. Certaines uvéites du cheval sont liées soit à une phase primaire d'invasion par les leptospires (auquel cas l'animal est généralement positif en MAT) soit une phase clinique tardive ou récidivante provoquée par un phénomène dit d'autoimmunisation. Ce phénomène s'expliquerait par la sensibilisation à une protéine de leptospire proche d'une protéine de leptospire. Cette protéine aurait une MM de 55-60 kDa et est donc différente de celle de PPL, protéine porteuse de la séquence PP décrite ici.

La figure 9 présente des résultats caractéristiques de 6 animaux atteints d'uvéite :

Les sérums 421 et 1992 correspondent à une cinétique sérologique du même animal. Lors du premier prélèvement l'animal était négatif en MAT et est devenu positif lors du deuxième prélèvement, attestant que cette uvéite pouvait être interprétée comme un signe d'infection évolutive en cours par les leptospires.

Les animaux 2077 et 6771 sont légèrement positifs en MAT mais aussi vis à vis de PP, confortent l'origine leptospirosique de l'uvéite observée.

En revanche Les animaux 3848 et 4507 développent une uvéite (probablement une récurrence) dont l'origine leptospirosique ne peut être confirmée par le MAT. En revanche ces animaux ont développé une forte réponse vis à vis de PP confortant l'origine leptospirosique de l'uvéite.

Bilan : ces résultats confirment l'intérêt du peptide en tant qu'antigène capable de mettre en évidence une réponse immunitaire à une infection par les leptospires.

Bilan global de l'utilisation diagnostique de PP : Quelle que soit l'espèce considérée, le peptide PP se révèle être un antigène capable de mettre en évidence une réponse immunitaire à une infection par les leptospires, et en particulier en phase précoce car une réponse anticorps IgM anti-PP peut être détectée alors que le titre MAT est encore négatif ou est sujet à caution dans le cas d'animaux vaccinés.

Exemple 5 : Réponse anticorps contre le peptide PP des gerbilles immunisées par PPL via l'adénovirus

Un protocole de vaccination/épreuve a permis de mettre en évidence la protection induite par une suspension du virus recombinant Ad-ppl qui exprime la protéine recombinante PPL (Demande Internationale WO01/59123, Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre-Fontaine G, Eloit M. « Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination ». Infect Immun. 2001 Nov; 69(11):6831-8.).

Les anticorps anti-PP ont été dosés chez la gerbille par la technique ELISA décrite ci-dessus avec une antiglobuline anti-gerbille biotinylée (BioAtlantic) au 1/3000 et comme révélateur de la streptavidine couplée à la peroxydase (RPN1231, Amersham pharmacia biotech).

Pour chaque lot de gerbilles, les sérums ont été regroupés aux différentes dates de prélèvements J0 (avant la première immunisation), J21 (avant la seconde immunisation), J35 (avant l'épreuve virulente) et J70 (35 jours après l'épreuve virulente).

Les résultats de la réponse anticorps IgG contre le peptide PP exprimée en DO corrigée à sont présentés dans la figure 10.

L'immunisation par la protéine PPL via l'adénovirus induit une réponse anticorps contre le peptide PP significative.

La réponse anticorps anti-PP, suite à la première injection apparaît rapidement pour le groupe immunisé par l'adénovirus exprimant la protéine recombinante PPL. La réponse anticorps reste stable entre le 21^{ème} jour et le 35^{ème} jour : la seconde immunisation n'a pas induit d'effet rappel, le maximum de la réponse vaccinale semble atteint dès le 21^{ème} jour.

L'épreuve canicola effectuée le 35^{ème} jour permet l'apparition d'une réponse contre le peptide PP dans le groupe témoin et provoque une réponse anamnétique dans le groupe immunisé par la protéine PPL via l'adénovirus.

On observe donc une réponse anticorps dirigée contre le peptide PP suite à l'immunisation par PPL via l'adénovirus et cette réponse anticorps peut avoir un rôle dans la protection observée sur ce groupe vacciné soumis à une EV canicola.

Bilan

La vaccination a induit une réponse anti-PP maximale pour la stimulation induite par la dose d'adénovirus exprimant PPL employée. La relance anamnétique provoquée par l'épreuve virulente suit une pente plus faible que la réponse développée par les témoins. La protéine PPL porteuse des épitopes PP étant sécrétée par les leptospires pathogènes, la stimulation antigénique induite par l'épreuve

virulente est plus faible chez les animaux protégés par la vaccination que chez les témoins, chez lesquels la souche virulente ne rencontre pas d'obstacle à sa multiplication.

Exemple 6 : Essai de vaccination par la protéine recombinante PPL

5 (comparatif) :

L'immunisation avec la protéine recombinante PPL a été effectuée sur le modèle gerbille afin de tester la protection susceptible d'être apportée par cette protéine. Les adjuvants permettent d'augmenter l'immunogénicité des antigènes en créant généralement une réaction inflammatoire qui ralentit l'élimination de l'antigène et favorise sa capture et sa présentation aux lymphocytes. La nature de l'adjuvant va orienter la production de cytokines favorisant le développement d'une réponse à médiation cellulaire ou humorale.

Trois adjuvants ont été testés : d'une part l'adjuvant de Freund dans l'expérience 1 et d'autre part le QS 21 (saponine) avec l'hydroxyde d'aluminium dans l'expérience 2.

Essai 1 : Adjuvant de Freund

L'immunisation par la protéine recombinante PPL a été effectuée sur le modèle gerbille et suivie d'une épreuve virulente canicola à 100 UT diluée à 10^{-1} (lot 1 et 2) et à 10^{-2} (lot 3 et 4)

Les résultats de cette expérience (taux de survie) sont présentés dans le tableau 2.

	Epreuve virulente 10^{-1}		Epreuve virulente 10^{-2}	
	Lot 1 (PPL)	Lot 2 témoin	Lot 3 (PPL)	Lot 4 témoin
	Morts/vivants	Morts/vivants	Morts/vivants	Morts/vivants
9/07/99	1/10	0/15	0/10	0/15
EV : Can, j0	0/9	0/15	0/10	0/15
J11	4/5	8/7	0/10	0/15
J12	4/1	4/3	1/9	1/8
J13	1/0	1/2	3/6	7/7
J14	0/0	0/2	2/4	1/6
J15	0/0	0/2	1/3	4/2
J16	0/0	0/2	0/3	0/2
J30	0/0	0/2	0/3	0/2
Vivants/effectif*	0/10	2/15	3/10	2/15

Tableau 2 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL avec l'adjuvant de Freund après épreuve virulente canicola

Caractères en GRAS : début de la mortalité des gerbilles pour chaque lot

* effectif considéré à partir de l'épreuve virulente J0

- 5 PPL en présence d'adjuvant de Freund quelle que soit l'épreuve virulente considérée avec celui des lots témoins correspondant, sont similaires.

La mortalité des lots soumis à la même épreuve virulente débute en même temps : le 11^{ème} et le 12^{ème} jour pour respectivement les épreuves virulentes à 100 UT diluée à 10^{-1} et 10^{-2} .

- 10 Cet essai n'a pas permis de mettre en évidence une protection significative induite par l'immunisation par la protéine recombinante PPL après une épreuve virulente canicola.

Essai 2 : Adjuvant hydroxyde d'alumine et QS 21

- 15 L'essai d'immunisation par la protéine recombinante PPL a été reconduite dans les mêmes conditions cependant la protéine a été adjuvée avec le QS 21 et l'hydroxyde d'alumine.

L'Immunisation de gerbilles par la protéine recombinante PPL adjuvée par le QS 21 et l'hydroxyde d'alumine a été suivie d'une épreuve virulente canicola. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

20

	Lot immunisé par PPL	Lot témoin
	Morts/vivants	Morts/vivants
6/04/2000	1/15	0/15
EV : Can, J0 19/04/2000	0/14	0/15
J8	1/13	2/13
J9	4/9	2/11
J10	0/9	2/9
J11	2/7	0/9
J12	0/7	0/9
J13	0/7	0/9
J30	0/7	0/9
Vivant/effectif*	7/14	9/15

Tableau 3 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL adjuvée par l'hydroxyde d'alumine et le QS 21 après épreuve virulente canicola

- 25 **Caractères en GRAS** : début de la mortalité des gerbilles pour chaque lot

* effectif considéré à partir de l'épreuve virulente J0

Le taux de survie pour le lot immunisé par la protéine recombinante PPL adjuvée et le lot témoin sont similaires. La mortalité des gerbilles des deux lots débute le même jour : le 8^{ème} jour.

5 Il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une protection significative apportée par la protéine recombinante PPL que ce soit en présence d'adjuvant de Freund ou l'hydroxyde d'alumine couplée à le QS 21.

Donc, quel que soit l'adjuvant utilisé, aucune protection significative suite à l'immunisation par la protéine recombinante PPL n'a pu être mise en évidence. Or,
10 un protocole de vaccination/épreuve a permis de mettre en évidence la protection induite par une suspension du virus recombinant Ad-*ppl* qui exprime la protéine recombinante PPL (Brevet WO01/59123, Branger et al, 2001). Il paraît donc essentiel de déterminer le ou les épitopes de la protéine PPL responsables de l'effet protecteur observé.

Dans cet objectif, l'effet protecteur du peptide PP a été comparé avec
15 celui obtenu avec PPL.

Exemple 7 : Essai de vaccination par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH

Le but de l'immunisation par le peptide PP sur le modèle gerbille est à la fois d'évaluer l'antigénicité de la séquence choisie par la réponse anticorps et l'éventuelle
20 protection apportée par ce peptide.

Essai 1 : Protocole de vaccination des gerbilles par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH

Un protocole de vaccination /épreuve a été mis en œuvre pour évaluer la protection que peut apporter le peptide PP (seq ID N°1) couplé à la protéine KLH.

25 Cette construction est administrée par voie sous cutanée sans adjuvant avec comme contrôle négatif du PBS (lot 2).

Lot1 : 10 gerbilles, 2 injections de 30 µg de PP-KLH sous 300 µl en sous cutanée

Lot 2 : 10 gerbilles, 2 injections de PBS sous 300 µl

30 Les deux injections sous un volume de 300 µl ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. Une épreuve virulente par injection par voie intra-péritonéale de 0,5 ml d'une culture canicola titrant 90 à 100 UT (turbidimétrie) diluée à $10^{-2.5}$ a été réalisée deux semaines après la seconde injection.

- Réponse antigénique : Suivi par ELISA de la réponse immunitaire
35 des gerbilles contre le peptide PP

Les anticorps anti-PP ont été dosés chez la gerbille par une technique ELISA (décrite ci-dessus) avec une antiglobuline anti-gerbille biotinylée (BioAtlantic) au

1/3000 et comme révélateur de la streptavidine couplée à la peroxydase (RPN1231, Amersham pharmacia biotech).

Pour chaque lot de gerbilles, les sérums ont été regroupés aux différentes dates de prélèvements j0 (avant la première immunisation), J14 (avant la seconde immunisation), J28 (avant l'épreuve virulente).

Les résultats de la réponse anticorps IgG contre le peptide PP exprimée en DO corrigée (DO des sérums traités corrigée par la DO du sérum témoin) sont présentés dans la figure 11.

L'immunisation par le peptide PP couplé à la KLH induit une réponse anticorps significative contre le peptide PP. La réponse anticorps anti-PP, suite à la première injection est très élevée puisque les sérums dilués au 1/6400 et au 1/12800 (figure 11, A) donnent une DO corrigée entre 0,8 et 1,2 (optimum de lecture). Un net effet rappel est provoqué par la seconde injection puisque la DO corrigée obtenue à j28 est supérieure au double de celle obtenue à j14 pour les trois dilutions observées (figure 11, B).

Conclusion :

L'antigénicité du peptide choisi est importante.

Protection contre EV

Les résultats de cet essai en terme de taux de mortalité et courbe de survie sont présentés respectivement dans le tableau 4 et la figure 12.

Date	Lot 1 PP-KLH	Lot 2 PBS
Av EV	10	10
EV *	10	10
J4	10	10
J5	10	10
J6	7	5
J7	5	3
J8	4	0
j9	4	0
j10	4	0
j11	4	0
J30	4	0
Taux de mortalité	6/10	10/10
Taux de survie	4/10	0/10

Tableau 4 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide

PP couplé à la protéine carrier KLH après épreuve virulente canicola $10^{-2,5}$.

La mortalité du lot 2 correspondant au groupe témoin ayant reçu du PBS (0/10) est très forte puisque à j8 aucune gerbille n'est survivante à une épreuve virulente *L. interrogans* sérovar canicola. Cette épreuve virulente est sévère car d'une part la DL100 a été atteinte en 8 jours et d'autre part la mortalité a débuté précocement, dès le 5^{ème} jour, et a été très rapide puisque tous les témoins sont morts en 3 jours. En revanche, on constate que 4 des 10 animaux du lot de gerbilles vaccinées par le peptide PP couplé à la protéine KLH survivent de façon définitive (surveillance de quatre semaines après épreuve virulente).

Cette expérience ne permet pas de démontrer au risque usuel de 0,05 une protection significative induite par le peptide PP contre un challenge Canicola $10^{-2,5}$. Cependant, cette protection existe pour un risque $p < 0,07$ (test de Logrank).

Essai 2 : Protocole de vaccination des gerbilles par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH

L'expérience de vaccination par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH a été reconduite dans les conditions similaires pour valider les résultats obtenus dans l'essai 1. Cependant, il nous a semblé intéressant de reproduire également cet essai avec le peptide non couplé compte tenu de la forte antigénicité du peptide PP mise en évidence dans l'essai 1.

Un essai de vaccination /épreuve a été mis en œuvre pour évaluer la protection que peut apporter le peptide PP (seq ID N°1) couplé ou non à la protéine KLH.

Cette construction est administrée par voie sous cutanée sans adjuvant, le PBS comme contrôle négatif est administré par la même voie (lot 3).

Lot 1 : 12 gerbilles, 2 injections de 30 µg de PP-KLH sous 300 µl

Lot 2 : 12 gerbilles, 2 injections de 30 µg de PP sous 300 µl

Lot 3 : 15 gerbilles, 2 injections de PBS sous 300 µl

Les deux injections sous un volume de 300 µl ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. Une épreuve virulente par injection par voie intra-péritonéale de 0,5 ml d'une culture de leptospires sérovar canicola titrant 90 à 100 UT (turbidimétrie) diluée à 10^{-2} a été réalisée trois semaines après la seconde injection.

Les résultats de cet essai en terme de taux de mortalité et courbe de survie sont présentés respectivement dans le tableau 5 et la figure 13 :

	Lot 1 PP-KLH	Lot 2 PP	Lot 3 Te (PBS)
EV : Can, jo	12	12	15
J4	0/12	0/12	0/15
J5	0/12	0/12	0/15
J6	0/12	0/12	1/15
J7	0/12	0/12	4/14
j8	0/12	2/12	1/10
j9	1/12	2/10	1/9
j10	0/11	0/8	0/8
j11	0/11	0/8	0/8
j12	0/11	0/8	0/7
j13	0/11	0/8	0/7
j14	0/11	0/8	0/7
j15	0/11	0/8	0/7
j16	0/11	0/8	0/7
j17	0/11	0/8	0/7
j28	0/11	0/8	0/7
Taux de mortalité	8.3	33.3	53.3
Taux de survie	91.6	66.7	46.7

Tableau 5 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH après épreuve virulente canicola¹⁰⁻².

La mortalité du lot 3, groupe témoin ayant reçu du PBS, est la plus forte de tous les lots et correspond à la dose létale 50 (7/15). La mortalité chez les témoins a débuté précocement dès J6 alors qu'elle ne commence qu'à J8 pour le lot immunisé par PP et J9 pour le lot immunisé par PP-KLH.

La mortalité dans le groupe immunisé par PP-KLH suite à une épreuve virulente *L. interrogans* sérovar canicola est la plus faible (1/12) et la plus tardive (J9), alors que celle du lot immunisé par PP est de 4/12 et débute à J8.

Bien que la protection observée par le peptide couplé à la protéine porteuse KLH soit plus efficace, cette expérience permet de mettre en évidence un effet protecteur induit par le peptide PP, couplé ou non à la protéine porteuse KLH, contre une épreuve virulente de leptospires sérovar canicola 10^{-2} à une probabilité $p < 0,02$ (test de Logrank)

Le taux de survie observé pour le lot immunisé par PP-KLH par voie sous cutanée confirme les résultats observés lors de la première expérimentation (Essai 1). Par ailleurs, le bilan de l'essai 1 suite à l'immunisation par le peptide PP confirme la forte immunogénicité de ce peptide et met en évidence son effet protecteur.

5 **Analyse statistique des résultats des deux expériences**

	Expérience 1		Expérience 2		cumul des deux essais	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
PP-KLH/control		$<7.10^{-2}$	6,84	$<1.10^{-2}$	10,1	$<2.10^{-3}$
PP/control	-	-	5,64	$<2.10^{-2}$	-	-

Tableau 6 : analyse statistique des essais vaccinations par le peptide PP couplé ou non selon le test de Logrank

Le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH apporte une protection significative contre un challenge canicola pour les deux expériences. Cette protection est significative sur la survie des animaux estimée par le test de logrank quelle que soit l'expérience ; la combinaison des deux expériences augmente la significativité de l'expérience que ce soit avec le test du χ^2 ou le test de Logrank.

Bilan

La vaccination avec le peptide PP couplé ou non à la protéine KLH a permis de montrer l'effet protecteur du peptide PP, à deux reprises, à la suite d'une épreuve virulente (canicola).

Exemple 8 : Essai de vaccination par le peptide PP couplé en NH_2 à la protéine porteuse KLH chez le chien.

Le but de l'immunisation de chiens par le peptide PP est d'évaluer l'effet protecteur apporté par ce peptide. La protection sera étudiée sous deux volets : protection clinique mais aussi protection contre le portage rénal.

• **Protocole de vaccination des chiens par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH**

Un protocole de vaccination /épreuve a été mis en œuvre pour évaluer la protection que peut apporter le peptide PP (seq ID N°1) couplé en NH_2 à la protéine porteuse KLH (Figure14).

Cette construction est administrée par voie sous cutanée sans adjuvant avec comme contrôle négatif du PBS (lot 2).

Lot1 : 6 chiens SPF, 2 injections de 250 μg de PP-KLH sous 1 ml en sous cutanée.

Lot 2 : 6 chiens SPF, contrôle

Les deux injections ont été administrées à 18 jours d'intervalle par voie sous cutanée.

L'Epreuve virulente (EV) a été réalisée à J_0 .

Les animaux reçoivent une épreuve virulente à raison d'une culture virulente de 4 à 6 jours. Pour un lot vacciné et un lot témoin, chaque animal reçoit 0,3mL dans chaque œil de la culture titrant 120 UT (soit 2×10^8 leptospires par mL) et par voie intra-péritonéale 4 mL de la même culture diluée au dixième.

- **BILAN :**

- Phase d'immunisation

La phase d'immunisation s'est déroulée de J_{-39} à J_{-1} (J_0 le jour de l'épreuve virulente), avec la première injection à J_{-35} et la seconde à J_{-18} .

La tolérance a été parfaite.

Lors de cette phase, le poids a été mesuré à J_{-39} , J_{-35} , J_{-28} , et J_{-7} (Figure 15).

L'évolution de l'augmentation moyenne des poids entre J_{-35} et J_{-7} n'est pas significativement différente entre les chiens témoins et vaccinés ($p=0.8509$), mais il y a une évolution significative du poids au cours du temps ($p<0.0001$).

- Phase d'épreuve :

La phase d'épreuve s'est déroulée de J_{-1} à J_{41} , avec l'épreuve à J_0 .

Lors de cette phase, la température a été mesurée à J_0 , J_1 , J_2 , J_3 , J_4 , J_5 , J_6 , J_7 .

Les paramètres hématologiques ont été mesurés à J_{-1} , J_3 , J_7 , J_{10} , J_{14} , J_{18} et J_{41} .

Les paramètres biochimiques ont été mesurés à J_{-1} , J_3 , J_7 , J_{10} , J_{14} , J_{18} , J_{25} et J_{41} .

- Survie

Aucune mortalité n'a été constatée suite à l'épreuve virulente

- Evolution de la température

L'évolution de la variation moyenne de la température entre J_0 et J_7 est représentée dans la figure 16. L'évolution de l'augmentation moyenne de la température entre J_0 et J_7 n'est pas significativement différente entre les chiens témoins et vaccinés ($p=0.7944$), Cependant ponctuellement, il existe une différence significative entre les chiens témoins et vaccinés à J_3 et J_4 ($p<0,05$). Les chiens témoins développent un pic fébrile plus accusé.

- Evolution des paramètres hématologiques :

- plaquettes

Les moyennes des plaquettes étant significativement différentes à J_{-1} , la valeur à J_{-1} est incluse dans le modèle d'analyse.

L'évolution de la variation moyenne des plaquettes entre J_{-1} et J_{41} est représentée dans la figure 17. L'évolution de la variation moyenne des plaquettes entre J_{-1} et J_{41} est significativement différente entre les chiens témoins et vaccinés ($p=0.0412$). L'évolution est significative au cours du temps ($p=0.0003$).

5 **La thrombocytopénie est significativement plus accusée chez les témoins que chez les vaccinés.**

- Evolution des globules blancs

L'évolution globale des globules blancs entre J_{-1} et J_{41} est représentée dans la figure 18.

10 L'évolution des globules blancs entre J_{-1} et J_{41} n'est pas significativement différente entre les chiens témoins et vaccinés ($p=0.4407$).

Cependant la leucopénie transitoire précédant la leucocytose (phénomène classique en matière de leptospirose) est significativement plus importante chez les témoins que chez les vaccinés à J_4 ($p<0.05$).

15 L'évolution de la formule leucocytaire a aussi été analysée.

Cette évolution a été étudiée en numération par classe de leucocyte, numération estimée par la formule sanguine et rapportée à la numération.

- Lymphocytes

20 L'évolution des lymphocytes entre J_{-1} et J_{41} est représentée dans la figure 19. Une lymphopénie significative est constatée à J_4 chez les témoins, parfaitement inaperçue chez les vaccinés chez lesquels seule la lymphoprolifération post-infectieuse est observée.

- Monocytes

25 L'évolution des monocytes entre J_{-1} et J_{41} est représentée dans la figure 20. La déplétion monocyttaire est observée précocement à J_4 chez les seuls témoins ($p<0,05$)

- Paramètres Biochimiques

30 L'hétérogénéité de la réaction des individus du lot témoin ne permet pas d'objectiver une protection contre l'atteinte rénale aiguë pour les deux paramètres biochimiques: taux de créatinine et d'urée dans le sang représentée respectivement dans les figures 21 et 22.

Si aucune différence significative ne peut être mise en évidence sur la totalité de la période de suivi, on constate deux périodes différentes :

35 - Période d'atteinte rénale aiguë (J_0 - J_{10}) : pas de différence significative entre témoins et vaccinés malgré une tendance ($p<0,15$) à une expression plus intense chez les témoins (urée plus élevée)

- Période de colonisation rénale (J_{10} - J_{41}) : au cours de cette période, le taux d'urée des témoins reste plus élevé et ce de façon significative ($p<0,02$).

- Résultats bactériologiques

La présence de leptospires a été étudiée conjointement par PCR (PCR spécifique des leptospires pathogènes) et par culture dans les urines à J₀, J₁₀, J₁₄, J₁₈, J₂₅, J₄₁ et dans les prélèvements de reins de chaque animal au terme de l'essai à J₄₁. Les résultats PCR sont figurés dans le tableau 8.

Par ailleurs, les résultats bactériologiques ont été quantifiés grâce à la mise en place d'un coefficient :

- par culture immédiate. Un seul leptospire vivant peut donner une culture positive. Une relative estimation de la concentration bactérienne est exprimée par un coefficient de 3 quand une culture s'est développée dans la troisième dilution sériée faite à partir du prélèvement.

- par PCR sur des prélèvements congelés. Une PCR positive ne préjuge pas de la viabilité des bactéries mises en évidence et par ailleurs une PCR n'est positive que pour 10² leptospires présents. Un coefficient de 1 a été attribué à une PCR avec un faible signal et un coefficient de 2 à une PCR fortement positive.

Le coefficient global correspond à la somme de la cotation de chaque chien rapportée à la cotation maximale qu'aurait obtenu l'ensemble des chiens. Ces résultats sont exprimés dans la figure 23.

En ce qui concerne la **septicémie**, on constate une concordance parfaite entre les deux tests à J₃ (Figure 23 et tableaux 7 et 8). Tous les animaux ont donc encore à cette date la souche d'épreuve circulante.

En ce qui concerne la **colonisation rénale**, Pour les deux lots, il convient de séparer les résultats finaux obtenus à partir des reins (3 juillet) de ceux obtenus à partir des urines.

Lors de l'euthanasie les deux groupes sont porteurs rénaux, portage détecté tant par culture que par PCR.

Cependant en ce qui concerne l'excrétion urinaire proprement dite, on constate une différence importante de l'évolution au cours de la période d'épreuve, des coefficients, obtenus tant pour les cultures que pour les PCR.

L'excrétion des leptospires dans les urines témoignant d'une colonisation rénale se révèle plus tardive ou à niveau plus faible chez les vaccinés (tableaux 7 et 8, figure 23). Il faut noter que la mise en culture des reins est une méthode de détection très sensible et ne permet pas la semi quantification qui a été faite pour culture et PCR.

CONCLUSION GLOBALE

Au cours de cet essai, nous avons démontré que l'immunisation par PP (seq ID N°1) couplée à une protéine porteuse permet d'induire une protection contre une épreuve virulente canicola chez le chien.

Plus particulièrement, nous avons observé :

- une limitation des perturbations générales (comportement et syndrome fébrile) de façon significative des chiens vaccinés par rapport aux chiens témoins

5 - une limitation des altérations hématologiques, plaquettes et leucocytes en particulier, et ce de façon significative chez les chiens vaccinés par rapport aux chiens témoins

- une limitation des atteintes rénales avec cette souche canicola dont le tropisme rénal est accusé, objectivé par :

10 Sur le plan fonctionnel : les taux d'urée et de créatinine sont plus faibles chez les vaccinés lors de la phase de septicémie que ceux observés chez les témoins.

La colonisation rénale plus tardivement détectée chez les chiens vaccinés que chez les chiens témoins correspond à une colonisation à plus faible bruit ou plus tardive. Or, le fait de constater simultanément sur les chiens témoins une augmentation significative de l'urée est en faveur d'une colonisation à plus faible niveau chez les
15 vaccinés.

	date	vacciné	Témoin
Plasma	J ₀	0/6	0/6
	J ₃	6/6	6/6
	J ₇	0/6	0/6
Urines	J ₇	3/6	6/6
	J ₁₄	2/6	4/6
	J ₁₈	3/6	5/6
	J ₂₅	4/6	6/6
Reins	J ₄₁	5/6	4/5

Tableau 7 : Résultats des cultures effectuées sur les prélèvements de plasma, d'urines et de reins des 6 chiens témoins et des 6 chiens vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé
20 à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* s1 sérovar canicola

	date	vacciné	Témoin
Plasma	J ₀	0/6	0/6
	J ₃	6/6	6/6
	J ₇	0/6	0/6
Urines	J ₁₄	2/6	3/6
	J ₁₈	1/6	6/6
	J ₂₅	3/6	4/6
	J ₄₁	4/6	4/6
	J ₄₁	1/6	2/6
Reins	J ₄₁	1/6	2/6

Tableau 8 : Résultats PCR sur les prélèvements plasma, urines et reins des 6 chiens témoins et des 6 chiens vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

REVENDICATIONS

1. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

5 - le peptide représenté par la séquence SEQ ID N°1 ci-dessous :

SEQ ID NO : 1 Lys-Ala-Lys-Pro-Val-Gln-Lys-Leu-Asp-Asp-Asp-
Asp-Asp-Gly-Asp-Asp-Thr-Tyr-Lys-Glu-Glu-Arg-His-Asn-Lys

ainsi que :

10 - les homologues de ce peptide présentant au moins 60% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1 et comportant de 15 à 40 amino acides,

- les dérivés de ce peptide sélectionnés parmi :

- les sels pharmaceutiquement acceptables de ce peptide,

- les fragments fonctionnels de ce peptide,

15 - les analogues chimiques de ce peptide choisis parmi ceux dans lesquels : un ou plusieurs acides aminés de la séquence peptidique ont été remplacés par leur énantiomère D ; une ou plusieurs liaisons amides peptidiques (-CO-NH-) ont été remplacées par une liaison isostère telle que : -CH₂NH-, CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH- (cis et trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- et -CH₂SO- ; un ou
20 plusieurs acides aminés ont été remplacés par un acide aminé non naturel,

- les dérivés chimiques de ce peptide choisis parmi : les composés des-alpha amino peptides ; les dérivés N-alpha acyl substitués de la forme RCO-, dans laquelle R représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou aralkyle, linéaire, ramifié, ou cyclique comprenant de 1 à 50 atomes de carbone ; les
25 dérivés substitués sur la fonction acide C-terminale par un groupement choisi parmi -NH₂, les alkyloxy, alkylthio ou alkylamino de la forme -OR, -SR or -NHR, dans lesquels R représente une chaîne alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou un groupement aralkyle, linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 1 à 50 atomes de carbone, les dérivés porteurs d'un substituant pharmacophore, les polymères de ce peptide.

30 2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente au moins 70% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1, encore plus préférentiellement 80%, de manière préférée au moins 90%, et encore plus favorablement au moins 95%, ou mieux, 98% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1.

3. Peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comporte de 20 à 30 acides aminés.
4. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est un fragment fonctionnel du peptide SEQ ID NO : 1 capable d'induire une réponse immunitaire
5. Peptide comportant au plus 100 acides aminés, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence selon la revendication 1 choisie parmi : SEQ ID NO : 1, un fragment fonctionnel de SEQ ID NO : 1, un homologue de SEQ ID NO : 1, un analogue chimique de SEQ ID NO : 1 ou un dérivé chimique de SEQ ID NO : 1.
6. Protéine comprenant un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 couplé à une protéine porteuse.
7. Anticorps caractérisé en ce qu'il reconnaît un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou une protéine selon la revendication 6.
8. Anticorps selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre le peptide de séquence SEQ ID NO : 1.
9. Anticorps selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est un anticorps polyclonal.
10. Anticorps selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est un anticorps monoclonal.
11. Fragment ou dérivé d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les fragments Fab, F(ab')₂, ScFv.
12. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il code un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou une protéine selon la revendication 6.
13. Vecteur, caractérisé en ce qu'il comporte un acide nucléique selon la revendication 12.
14. Cellule recombinante comprenant un acide nucléique ou un vecteur selon l'une quelconque des revendications 12 et 13.
15. Organisme transgénique non humain comprenant un acide nucléique selon la revendication 12 dans ses cellules.
16. Sonde ou amorce nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique selon la revendication 12.
17. Utilisation d'une sonde ou d'une amorce selon la revendication 16 pour la détection *in vitro* de la présence de souches pathogènes de leptospires dans un échantillon biologique ou une eau contaminée.
18. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 7 à 11 pour la détection *in vitro* de la présence de souches pathogènes de leptospires dans un échantillon biologique ou une eau contaminée.

19. Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou d'une protéine selon la revendication 6 pour la détection *in vitro* de la présence d'anticorps anti-leptospire dans un échantillon biologique.

5 20. Kit pour la détection *in vitro* de la présence de souches pathogènes de leptospires dans un échantillon biologique ou une eau contaminée caractérisée en ce qu'il comporte une sonde ou un oligonucléotide ou un couple d'amorces selon la revendication 16.

10 21. Composition pharmaceutique comprenant un peptide ou une protéine ou un anticorps ou un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 et un support pharmaceutiquement acceptable.

22. Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin.

23. Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une préparation d'anticorps anti-PP à usage thérapeutique

15 24. Utilisation d'un acide nucléique ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 12 et 13 pour la production *in vitro* d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou d'une protéine selon la revendication 6.

20 25. Utilisation d'un acide nucléique ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 12 et 13 pour la production *ex vivo* d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou d'une protéine selon la revendication 6.

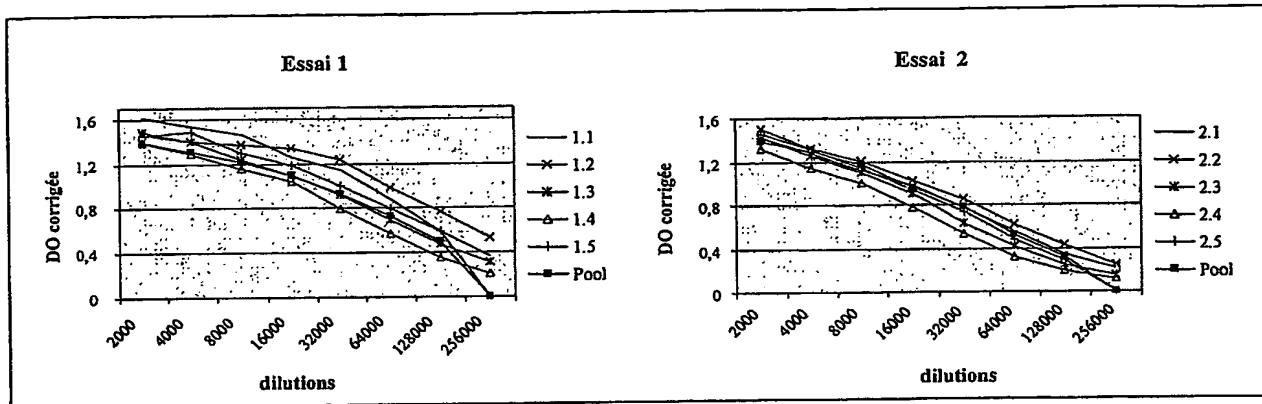


Figure 1 : Réponse anticorps IgG₁ de 5 souris immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH pour l'essai 1 et 2 exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

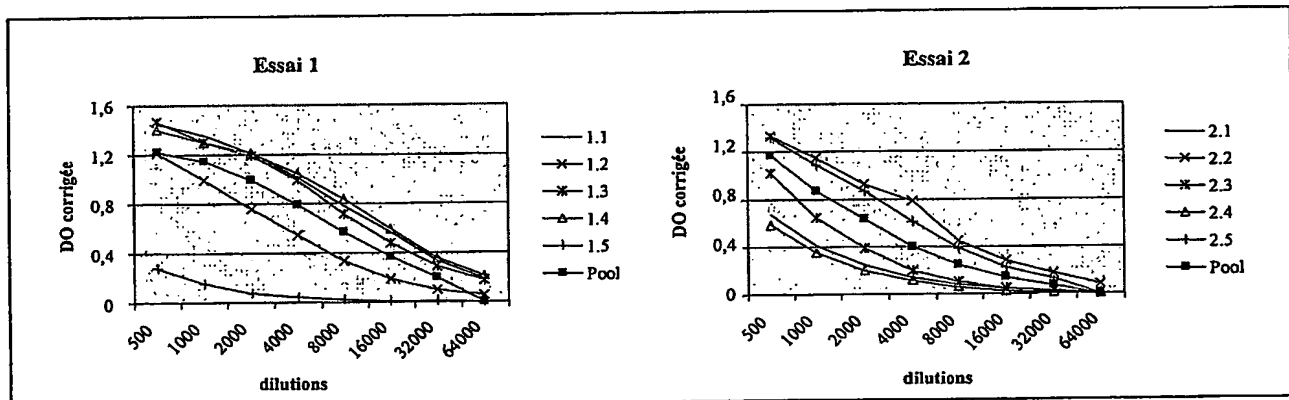


Figure 2 : Réponse anticorps IgG_{2A} de 5 souris immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH pour l'essai 1 et 2 exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

2/13

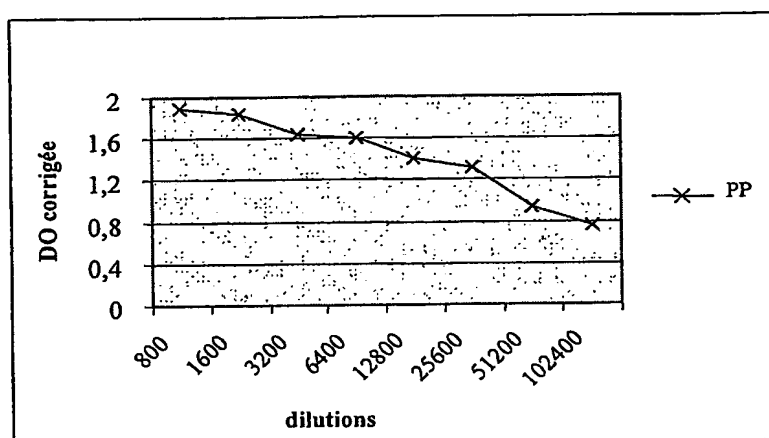


Figure 3 : Réponse anticorps IgG de lapin immunisé par le peptide PP exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

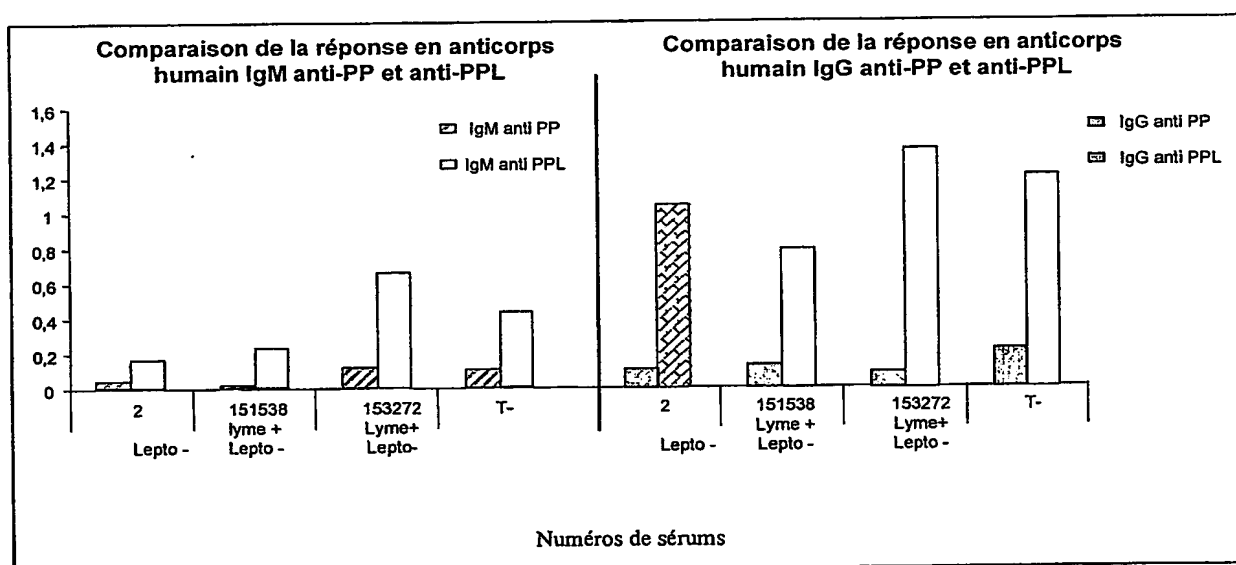


Figure 4 : Comparaison de la Réponse anticorps IgM et IgG de sérums provenant de malades humains non atteints de leptospirose (confirmée par le MAT) mais atteints de la maladie de Lyme pour deux d'entre eux (sérum 151538 et 153272) contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL exprimée en densité optique (DO).

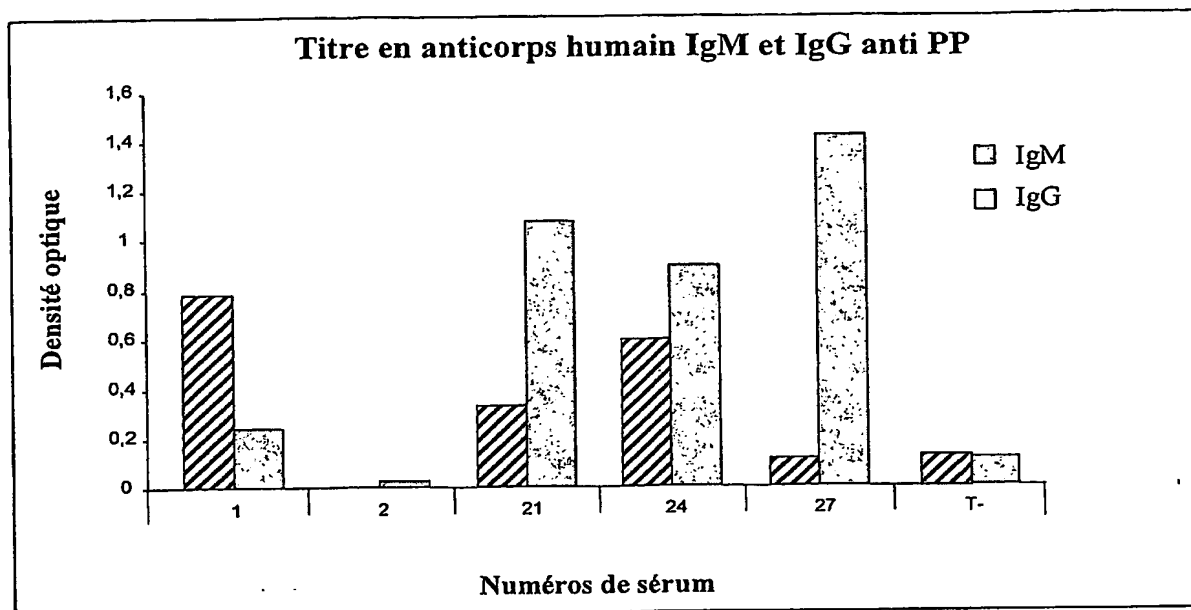


Figure 5 : Réponse anticorps IgM et IgG de 5 sérums provenant de malades humains atteints de leptospirose confirmée ou non par le MAT contre le peptide PP exprimée en densité optique (DO).

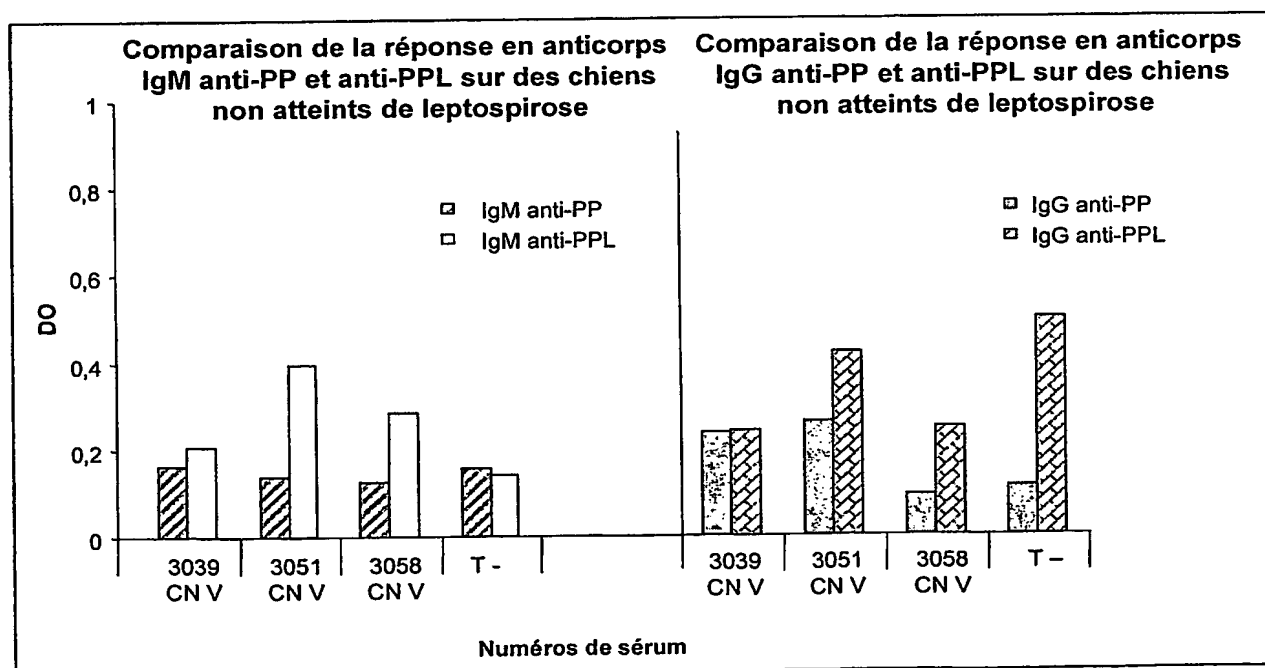


Figure 6 : Réponse comparée PP et PPL, soit IgM, soit IgG, pour des sérums provenant de 4 chiens SPF dont trois sont vaccinés contre la leptospirose (CN V) exprimée en densité optique (DO).

4/13

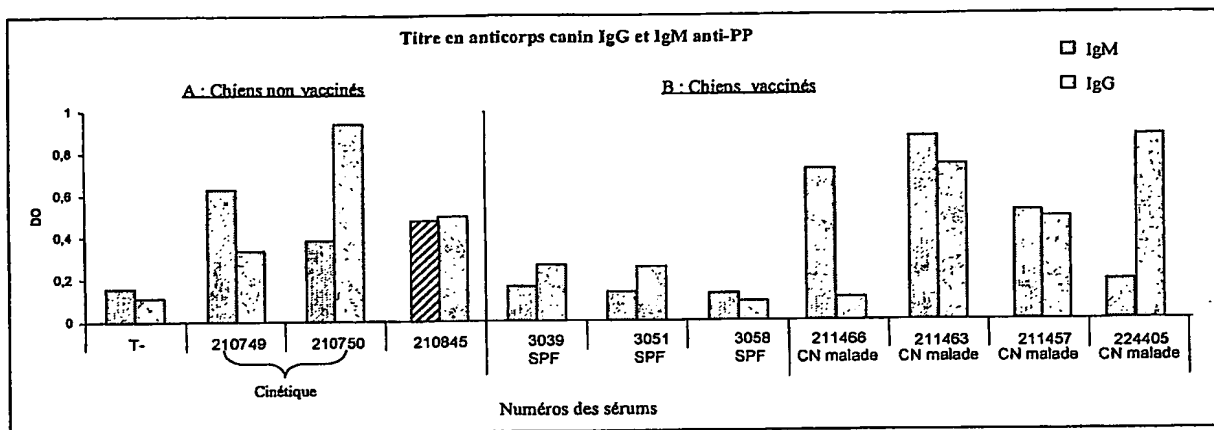


Figure 7 : Réponse anticorps IgM et IgG de 7 sérums provenant de chiens, suspects cliniques (leptospirose confirmée par le MAT) comparée à celle de 3 chiens sains SPF vaccinés (3039, 3051, 3058) contre le peptide PP exprimée en densité optique (DO) ; les N° 210749 et 210750 proviennent d'un même animal prélevé à 4 jours d'intervalle (CN = chien)

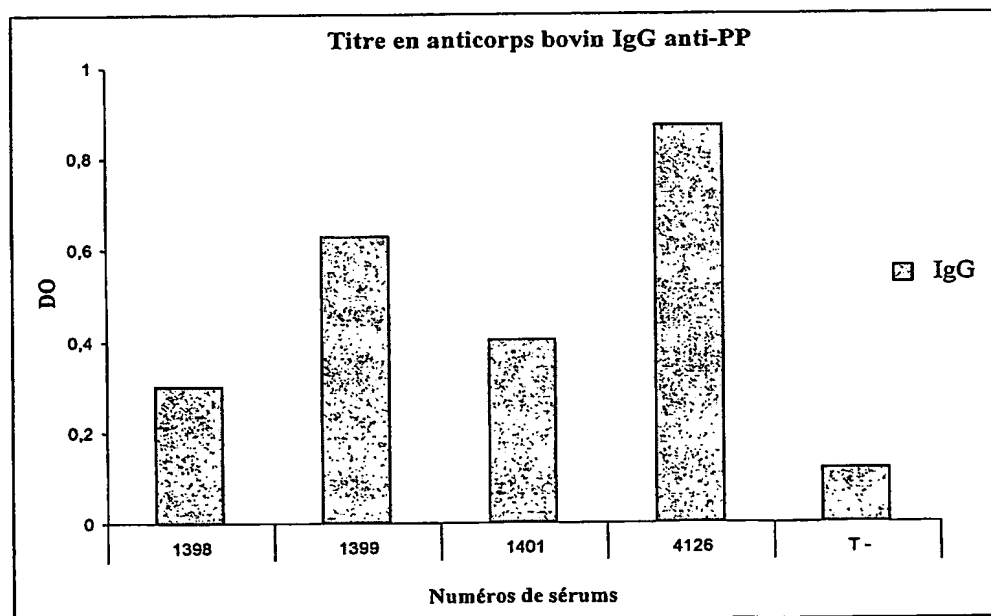


Figure 8 : Réponse anticorps IgG de 4 sérums bovins issus de cheptels suspectés atteints de leptospirose contre le peptide PP exprimée en densité optique.

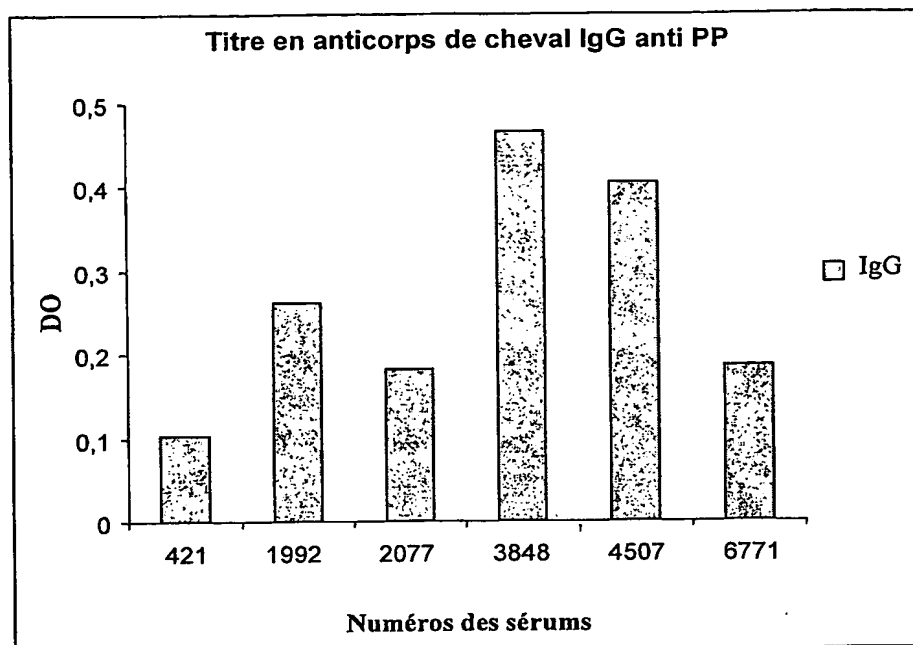


Figure 9 : Réponse anticorps IgG de 6 sérums équins contre le peptide PP exprimée en densité optique.

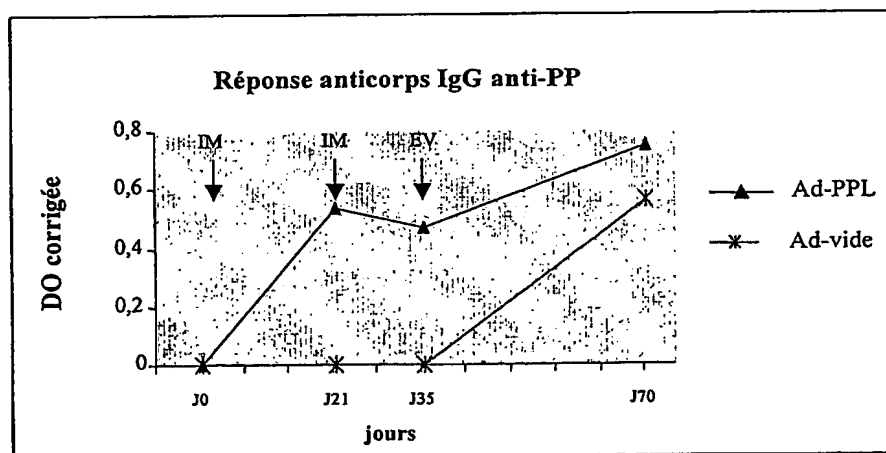


Figure 10 : Cinétique de la réponse anticorps contre le peptide PP exprimée en densité optique corrigée des gerbilles immunisées via l'adénovirus.

6/13

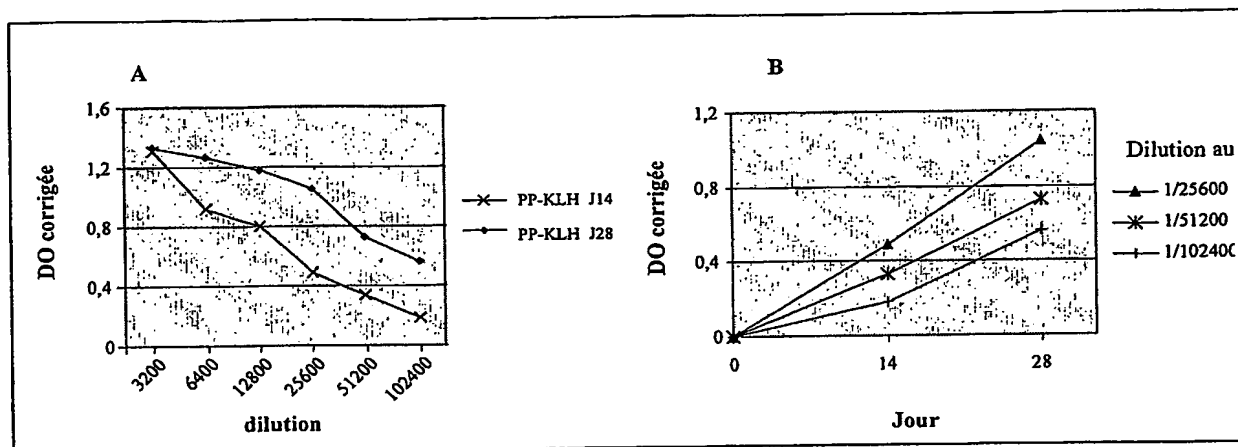


Figure 11 : Cinétique de la réponse anticorps IgG contre le peptide PP exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution (A) ou du temps (B) de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH.

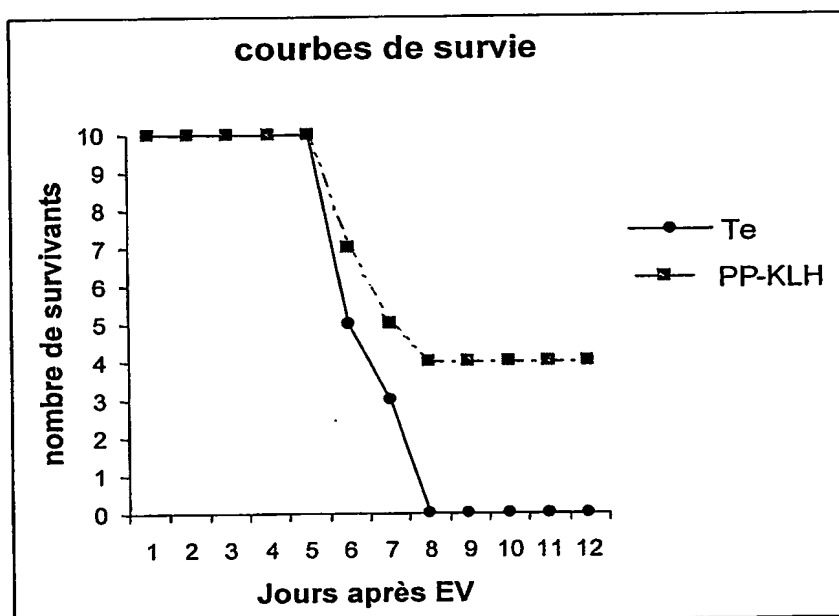


Figure 12 : Courbe de survie de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH et soumises à une épreuve virulente (EV) de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola.

7/13

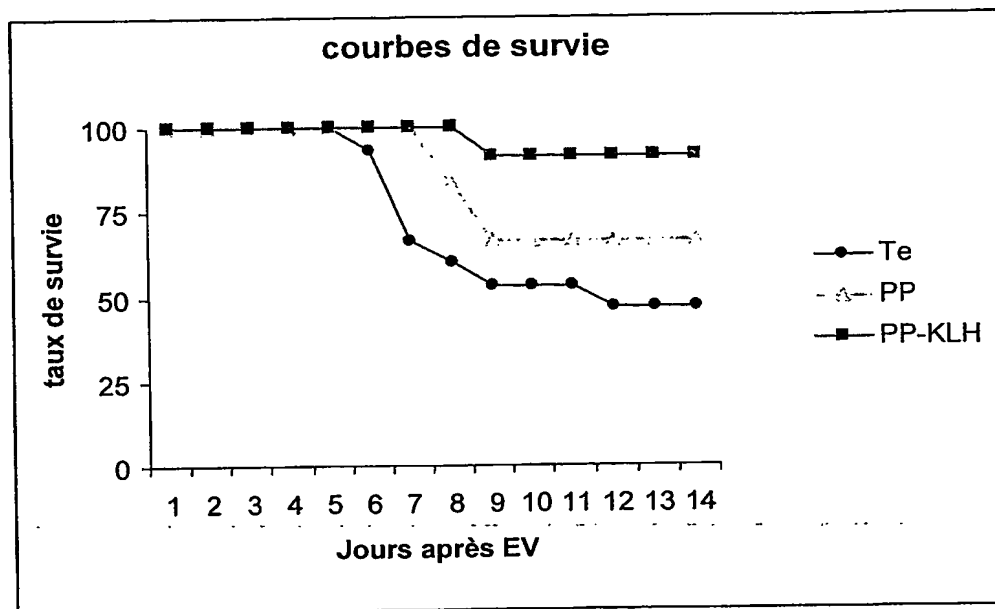


Figure 13 : Courbe de survie de gerbilles immunisées par PP-KLH ou PP et soumises à une EV de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola.

9/13

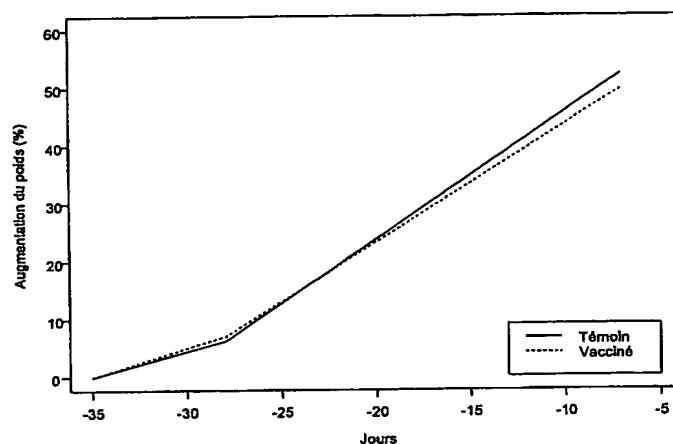


Figure 15 : Evolution de l'augmentation du poids des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) avant épreuve virulente

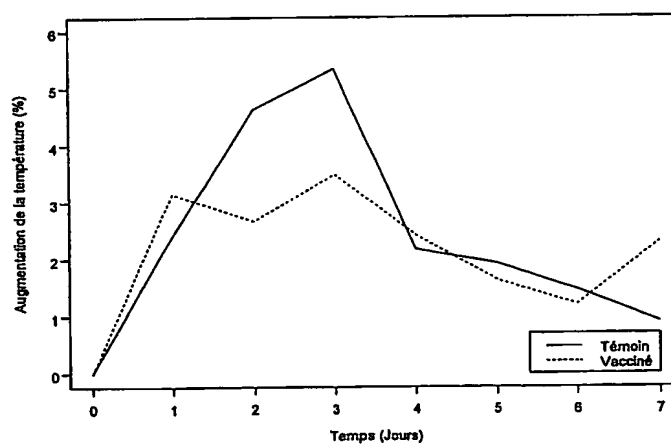


Figure 16 : Evolution de l'augmentation de la température des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

10/13

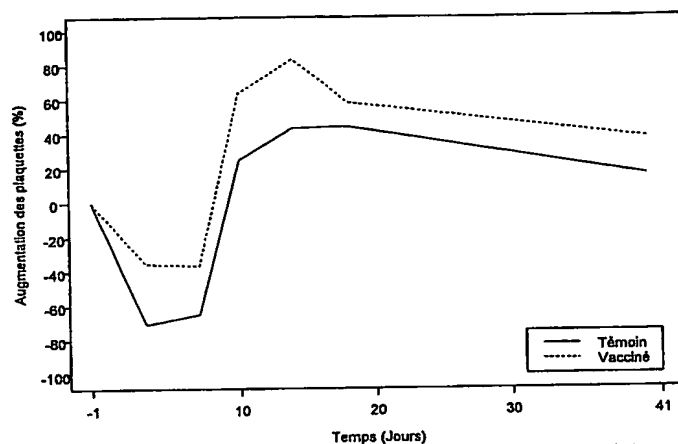


Figure 17 : Evolution de la variation des plaquettes des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

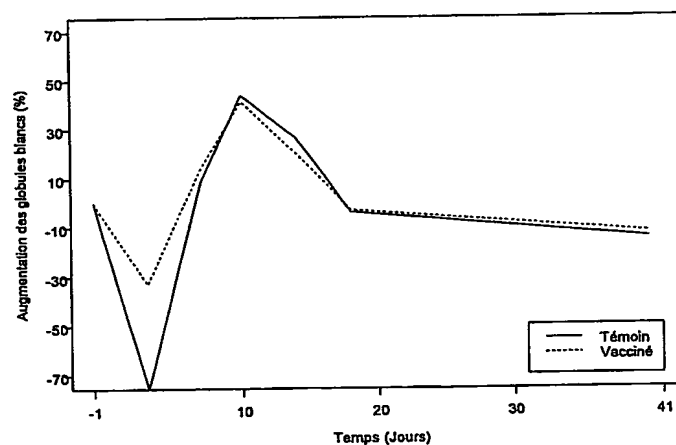


Figure 18 : Evolution quantitative de la variation des globules blancs des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

11/13

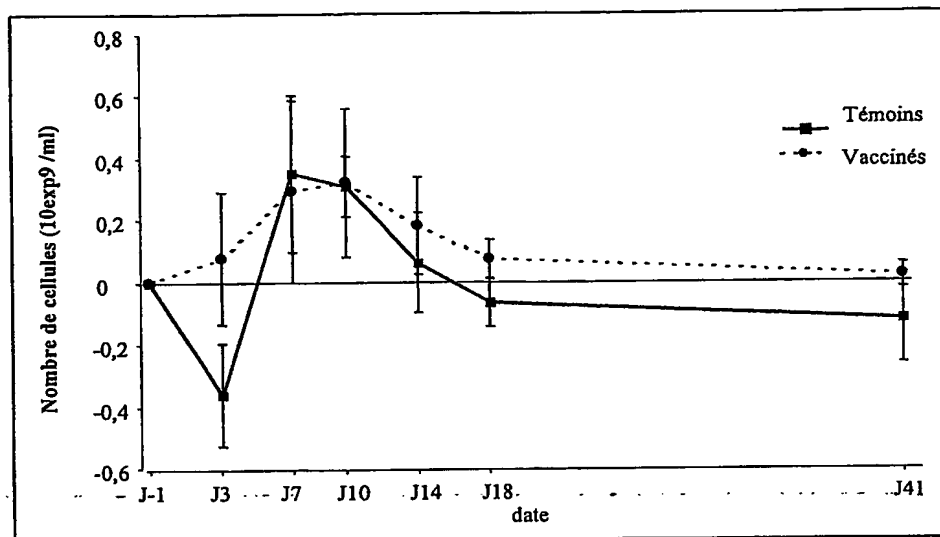


Figure 19 : Evolution quantitative de la variation des lymphocytes des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

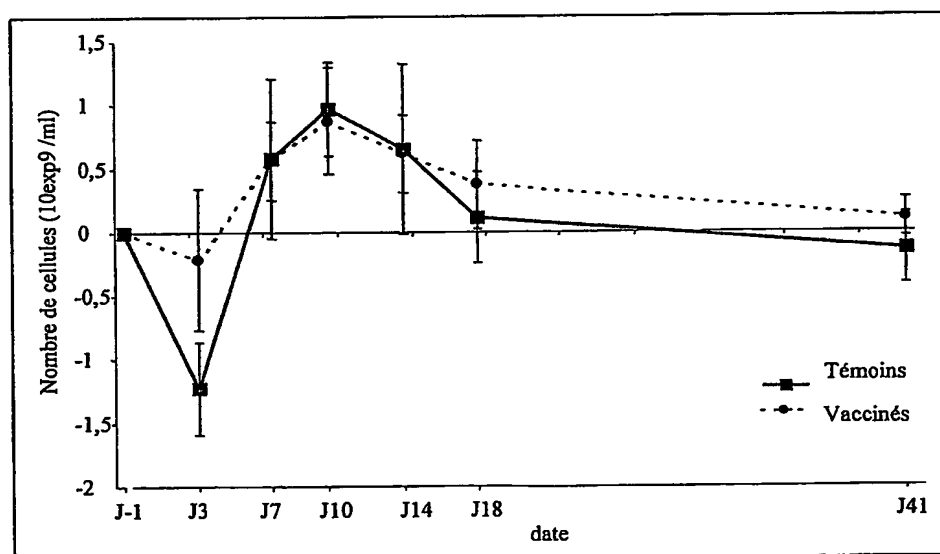


Figure 20 : Evolution quantitative de la variation des monocytes des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

12/13

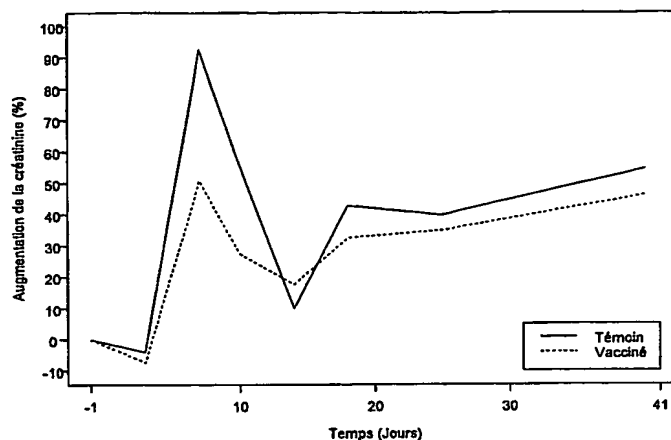


Figure 21 : Evolution de l'augmentation de la créatinine des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

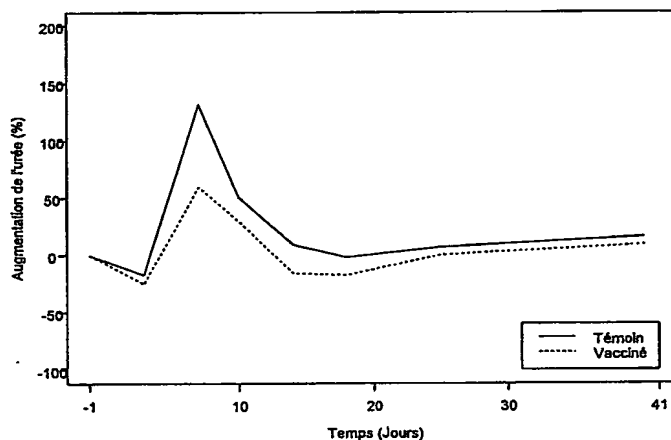


Figure 22 : Evolution de l'augmentation de l'urée des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

13/13

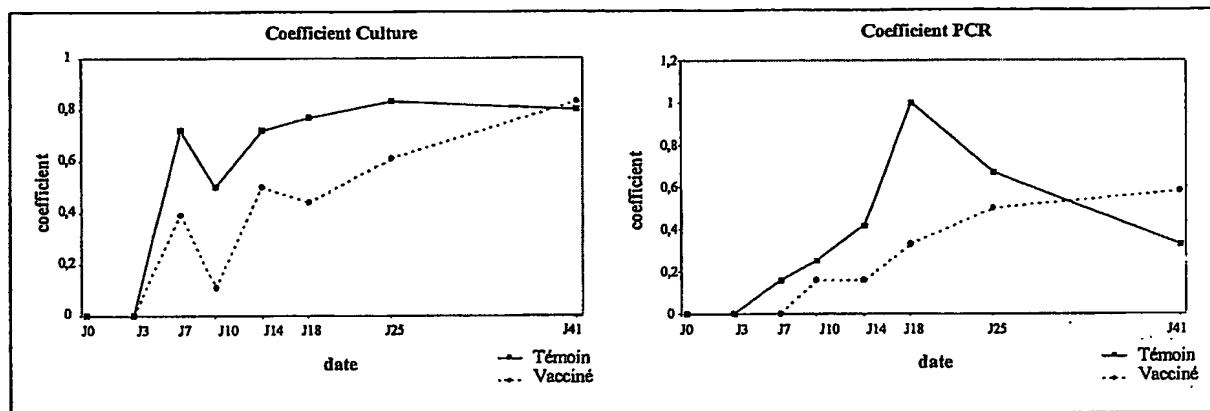


Figure 23 : Evolution du coefficient cumulé obtenu pour les cultures et PCR des lots des chiens témoins et vaccinés (immunisés par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH) soumis à une épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola

004s79.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> VIRBAC

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

<120> NOUVEAUX PEPTIDES POUR LA PREVENTION, LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE
LA LEPTOSPIROSE ANIMALE ET/OU HUMAINE

<130> VCsts004-79

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 1

Lys Ala Lys Pro Val Gln Lys Leu Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp
1 5 10 15Thr Tyr Lys Glu Glu Arg His Asn Lys
20 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/03154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/59123 A (BRANGER CHRISTINE ; ENVT TOULOUSE (FR); VIRBAC (FR); ANDRE FONTAINE) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document	1-25
X	WO 99/42478 A (UNIV CALIFORNIA) 26 August 1999 (1999-08-26) the whole document	1-25
X	WO 96/36355 A (UNIV CALIFORNIA) 21 November 1996 (1996-11-21) cited in the application the whole document	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2004

Date of mailing of the international search report

16/04/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schwachtgen, J-L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 03/03154

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0159123	A	16-08-2001	FR	2804685 A1	10-08-2001
			AU	3563601 A	20-08-2001
			EP	1254233 A1	06-11-2002
			WO	0159123 A1	16-08-2001
			US	2003124567 A1	03-07-2003
WO 9942478	A	26-08-1999	US	6306623 B1	23-10-2001
			AU	3310399 A	06-09-1999
			BR	9908234 A	31-10-2000
			EP	1056865 A2	06-12-2000
			JP	2002504319 T	12-02-2002
			WO	9942478 A2	26-08-1999
			US	2002127239 A1	12-09-2002
WO 9636355	A	21-11-1996	ZA	9901443 A	27-10-1999
			US	5837263 A	17-11-1998
			AT	246002 T	15-08-2003
			AU	712882 B2	18-11-1999
			AU	5863796 A	29-11-1996
			CA	2220674 A1	21-11-1996
			DE	69629304 D1	04-09-2003
			EP	0837694 A1	29-04-1998
			JP	11505708 T	25-05-1999
			WO	9636355 A1	21-11-1996
			US	2002127240 A1	12-09-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/03154

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K14/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/59123 A (BRANGER CHRISTINE ; ENVT TOULOUSE (FR); VIRBAC (FR); ANDRE FONTAINE) 16 août 2001 (2001-08-16) le document en entier	1-25
X	WO 99/42478 A (UNIV CALIFORNIA) 26 août 1999 (1999-08-26) le document en entier	1-25
X	WO 96/36355 A (UNIV CALIFORNIA) 21 novembre 1996 (1996-11-21) cité dans la demande le document en entier	1-25

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 avril 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/04/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schwachtgen, J-L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/03154

Document brevet cité au rapport de recherche		Date d publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0159123	A	16-08-2001	FR 2804685 A1	10-08-2001
			AU 3563601 A	20-08-2001
			EP 1254233 A1	06-11-2002
			WO 0159123 A1	16-08-2001
			US 2003124567 A1	03-07-2003
WO 9942478	A	26-08-1999	US 6306623 B1	23-10-2001
			AU 3310399 A	06-09-1999
			BR 9908234 A	31-10-2000
			EP 1056865 A2	06-12-2000
			JP 2002504319 T	12-02-2002
			WO 9942478 A2	26-08-1999
			US 2002127239 A1	12-09-2002
			ZA 9901443 A	27-10-1999
WO 9636355	A	21-11-1996	US 5837263 A	17-11-1998
			AT 246002 T	15-08-2003
			AU 712882 B2	18-11-1999
			AU 5863796 A	29-11-1996
			CA 2220674 A1	21-11-1996
			DE 69629304 D1	04-09-2003
			EP 0837694 A1	29-04-1998
			JP 11505708 T	25-05-1999
			WO 9636355 A1	21-11-1996
			US 2002127240 A1	12-09-2002